



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DEL LIQUEN DE
ISLANDIA**

Autor: María Briñón González

D.N.I.:51429444-H

Tutor: Pradeep K. Divakar

Convocatoria:Febrero

RESUMEN

Cetraria Islandica es una especie de líquen de las zonas montañosas y frías de Europa que es usado tradicionalmente en afecciones respiratorias y digestivas. Actualmente se han empezado a hacer más estudios sobre él, descubriendo su actividad antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria y anticancerígena, que junto a otros líquenes les está haciendo ganar popularidad entre la población. En los herbolarios se vende líquen de Islandia o musgo de Islandia en forma de extracto, infusiones o plantas desecadas. Ya que en España se da la venta libre de plantas medicinales y este líquen es de difícil acceso, se ha querido comprobar si se realizan falsificaciones o adulteraciones de él. Para ello se ha realizado la técnica de identificación molecular y código de barras de ADN (ADN barcoding) que ha demostrado mayor eficacia a la hora de clasificar e identificar las muestras de líquenes, debido a su increíble parecido tanto morfológico como químico entre especies del mismo género que dan lugar a errores.

ABSTRACT

Cetraria Islandica is a lichen species from cold mountain areas of Europe that is traditionally used in respiratory and digestive disorders. Currently, there has been made advances on its uses specifically discovering its antioxidant, antidiabetic, antiinflammatory and anticarcinogenic activity, which together with other lichens is making them gain more popularity among the population. The Iceland lichen or Iceland moss is sold in the herbalist as extracts, infusions or dried plants. Because in Spain there is an open sale of medicinal plants and this lichen is difficult to get, we wanted to test if any forgery or adulteration has been made. In order to reach the goal, we have used molecular identification technique including DNA barcodings. This technique has been proved to be more effective for sample identification and classification in lichens than the morphological or chemical based approach, due to its incredible resemblance between species and morphological convergence.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Cetraria islandica (L.) Ach. (Fig. 1-2) pertenece a la familia Parmeliaceae de hongos liquenizados de Ascomycota¹. Tiene un talo de 2-10 cm de alto, fruticuloso, erecto o decumbente, con lóbulos de 0,1-1 mm de ancho, acanalados y ligeramente ramificados. Su cara superior es marrón rojizo o grisáceo y gris verdoso cuando está en posiciones de sombra. Tiene proyecciones marginales de 0,1-1 mm, que parecen espínulas. Su cara inferior es del mismo color que la superior y tiene pseudocifelas blanquecinas, que también suelen aparecer en los márgenes. Los apotecios son de 0,2-2 mm de ancho marrón oscuro, aunque es raro que los tenga. Su margen es frecuentemente talino, crenulado. Cuenta con picnidios de 6-7 x 1 μ m en los márgenes, pero son más frecuentes en los ápices de las proyecciones. Su médula y pseudocifelas son PD+ naranja rojizo, K- o rara vez K+ amarillo, y C- .Contiene ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico y ácido protoliquesterínico².

Es Terrícola y/o muscícola. Crece en suelos minerales u orgánicos, en altas montañas de ambos hemisferios, más frecuente a partir del límite superior de los portes arbóreos. Se reconocen diferentes subespecies en todo el mundo y es común en el oeste de Nepal, Himalaya y en las regiones templadas y alpinas. Popularmente se la conoce como Musgo o liquen de Islandia y es el liquen más ampliamente utilizado en medicina ³.En la península está extendida por los sistemas montañosos del Norte y Centro, pero no es abundante⁴.



Fig.1-2.*Cetraria islandica* (L.) Ach. ,Familia Parmeliaceae(imagen tomada de <http://www.lichens.ie>)

Históricamente, el musgo de Islandia se ha utilizado para la producción de antibióticos que curan la tuberculosis siendo mencionado en la Farmacopea Universalis de 1846 y en la Farmacopea

de Finlandia en 1915 ⁵En Europa se ha utilizado en Francia para este fin y como emoliente pectoral⁶, en Suecia para el catarro crónico, tuberculosis, tosferina y otras enfermedades pulmonares ⁷ y en el noreste de Italia, como reconstituyente después de la tuberculosis y anticatarrales⁸.

El musgo de Islandia es un tónico nutritivo y calmante con un ligero efecto laxante. Ayuda a mejorar el apetito, al estimular la producción de saliva y de jugos gástricos, y la digestión de los ancianos y los que se recuperan de una enfermedad debilitante. Se ha tomado como una decocción o como un tónico a base de hierbas en Europa como dieta ligera o en dispepsia, disentería o diarrea crónica ⁹En la medicina popular europea, se ha utilizado en el tratamiento del cáncer ¹⁰.

Cetraria islandica ha sido la especie más usada como alimento en los países nórdicos. Se ha consumido durante el siglo XIX en épocas de escasez de alimento, tras períodos de heladas y sequía en Noruega, Suecia, Finlandia e Islandia, desecándola para fabricar pan (Brødmose), mezclada con harina o arroz. Otras veces, *C. islandica* era mezclada con patatas o cereales¹¹ llamada “fjallagrasamj”, que consiste en añadir *Cetraria Islandica* a leche caliente con azúcar. Actualmente *C. islandica* forma parte de la composición de los caramelos “Soprano lozenges” y “Soprano original” (Fig.3), comercializados en Islandia, que son recomendados para oradores, docentes y cantantes, por su contenido en polisacáridos y en ciertos ácidos liquénicos. Los líquenes se han usado en Francia y otros países en la fabricación de chocolates y pasteles (Fig.2) ¹².

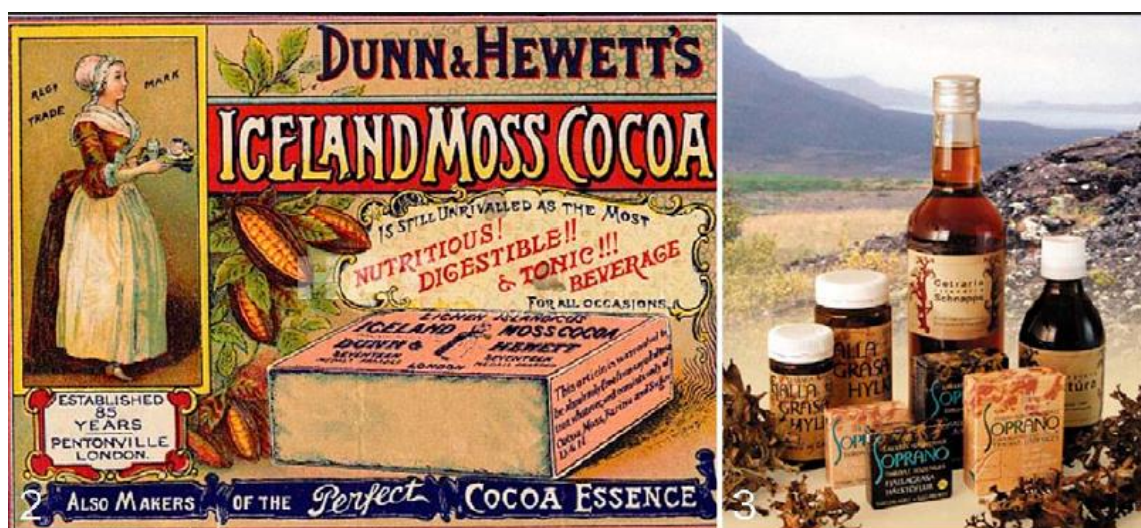


Fig.3. Etiqueta del chocolate fabricado con *Cetraria islandica* (L.) Ach. por Dunn & Hewett's. Fig. 4. Productos comercializados por la empresa islandesa Iceherbs Ltd. que llevan como ingrediente *Cetraria islandica* (imagen tomada de <http://www.iceherbs.is/>)

Actualmente en Suecia y Finlandia se vende en las farmacias y tiendas de alimentos naturales como expectorante, aperitivo, tónico o laxante ¹³. También se vende para la diabetes, enfermedades pulmonares y el catarro en Suecia ¹⁴ y como pastillas para el dolor de garganta por la compañía Hunziker en Suiza¹⁵. En otras partes este remedio popular se utiliza también para los riñones y la vejiga, así como para las heridas mal cicatrizadas¹⁶. Se puede utilizar para el hipotiroidismo y la anemia debido a su contenido en trazas de yodo y hierro³. En Islandia se utiliza en homeopatía para la bronquitis aguda y crónica, asma y dolores en el pecho al toser¹⁷.

A parte de sus usos tradicionales, en la actualidad se han estado realizando estudios y ensayos in vivo e in vitro, tanto en animales como pacientes, para comprobar las actividades de diferentes tipos de extractos de *Cetraria islandica* y así poder demostrar y descubrir nuevas propiedades:

- **Antioxidantes:** extractos con metanol fueron capaces de revertir el estrés oxidativo generado por la aflatoxina B1 (AFB1) en linfocitos humanos cultivados al provocar un crecimiento en la actividad de SOD y GPx y un descenso en el nivel de MDA18. El extracto acuoso inhibe fuertemente la peroxidación del ácido linoleico y a los radicales libres scavenged incluso más eficientemente que el α -tocoferol¹⁹.
- **Antiinflamatoria:** se ha realizado un estudio in vivo en pacientes en el que se concluye que un tratamiento con una fórmula del líquen causa una reducción directa de la inflamación, y donde se observaron cambios patológicos en la mucosa oral²⁰. Experimentos recientes in vivo donde se inyecta subcutáneamente extractos acuosos de *Cetraria* sugieren una significativa reducción de la artritis BSA inducida a ratas ²¹.
- **Antidiabético:** Estudios in vitro del efecto del extracto acuoso de *Cetraria islandica* sobre el estrés oxidativo inducido por diabetes han demostrado que este extracto a 5 y 10 mg/ml aumenta la capacidad antioxidante en la sangre de pacientes diabéticos. Por el contrario, no se vieron efectos antioxidantes beneficiosos en ratas diabéticas tratadas con 250-500mg por kg de este mismo extracto peritonealmente²².
- **Antiangiogénico:** El ácido protoliqueterínico demostró ser inhibidor de plaquetas de tipo 12- (S) - lipoxigenasa en un sistema in vitro en plaquetas. Este compuesto probó ser un

inhibidor(a 100 mg/ml se dio un 98,5% de inhibición) de esta enzima de la que se ha sugerido que juega un papel importante en carcinogénesis, angiogénesis y metástasis²³.

Con todas estas características y el aumento del consumo de plantas medicinales en España, no es de extrañar que puedan darse adulteraciones o falsificaciones en este líquen, ya que no es fácil de obtener en nuestro país y otros tipos de líquenes podrían recolectarse con mayor facilidad y por tanto más económicamente. La falsificación o adulteración en plantas medicinales se puede dar fácilmente en España, ya que debido al registro no obligatorio de estas, no es necesario tener un límite de calidad.

Para investigar y determinar si se producen estas falsificaciones se debe hacer una identificación de la planta medicinal mediante técnicas morfológicas, anatómicas, químicas o moleculares. Muchos estudios han demostrado que la convergencia morfológica y química entre especies en líquenes y en hongos en general es enorme. La identificación precisa de muestras de líquenes es un reto en grupos con caracteres taxonómicamente sutiles o escasamente diferenciables como es el caso del género *Cetraria*, donde el uso del Barcoding de ADN puede proporcionar un medio eficaz para la correcta identificación y diferenciación del material genuino de las adulteraciones o falsificaciones²⁴.

DNAbarcoding o código de barras de ADN puede definirse como el uso de pequeñas secuencias de ADN nuclear o de orgánulos para la identificación de un organismo. Tiene una clara función que es la identificación de muestras no conocidas utilizando una clasificación preexistente. Ya ha pasado una década desde que se propusiera que la enzima mitocondrial CO 1 (citocromo oxidasa 1) que codifica ADN podría utilizarse para generar código de barras de ADN en los animales²⁵. Como los genes mitocondriales de las plantas evolucionan lentamente con muy baja sustitución, no se consideraron adecuados para esta técnica²⁶.

Una alternativa es el uso de genomas de cloroplastos/núcleos que tienen altas tasas de sustitución. Muchas regiones genómicas de los cloroplasto (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *rpl36-RPS8*, *STI* y *5S rRNA*) han sido evaluados en sistemas vegetales por "El Consorcio para el Código de barras del Grupo de Trabajo Plant Life (CBOL)"²⁷, de los cuales *rbcL* se considera como universal, pero está teniendo baja resolución de especies, al contrario que *matK*. La combinación de estos dos marcadores podría mostrar mejores resultados y por lo tanto incluyó ITS nucleares para la combinación *matK* + *rbcL* con el objetivo de tener una mejor capacidad de discriminación en las especies que estén estrechamente relacionadas²⁶.

Para los hongos y líquenes, el espaciador transcribible interno (ITS) del ADN ribosomal ha sido universalmente aceptado como marcador de ADN barcoding por el Consorcio del código de barras de la Vida²⁸. Por otra parte, este marcador ha demostrado ser eficaz para la correcta identificación de muestras de los líquenes²⁴. Por esta razón, fue elegido como el marcador para la identificación de las muestras de *Cetraria islandica*.

Varios estudios han aparecido sobre la autenticación de plantas medicinales a través de códigos de barras de ADN con muy buenos resultados. Un muy buen ejemplo es el de *Crocus Sativus* (azafrán), una de las especies medicinales más importantes y de las más costosas. Debido a su alto valor de mercado, esta hierba es a menudo adulterada con otras como *Carthamus tinctorius*, *Caléndula officinalis*, *Hemerocallis L*, *Curcuma longa*... Se dio una detección precisa y muy útil de estos adulterantes en el azafrán comercializado con la aplicación del método de análisis de la curva de fusión de código de barras (Bar-MCA)²⁶.

Los marcadores de ADN o ADN barcoding al usar secuencias de nucleótidos para identificar una especie son independiente de la edad que tenga la planta, la parte del tejido de donde se obtenga la muestra y los factores medioambientales. Sumando a esto la mayor capacidad de diferenciación entre especies o incluso subespecies la hacen el mejor de los modelos de identificación²⁶.

Cada técnica está enfocada a un componente particular del genoma o ninguno en particular lo que lo hace único y un reto en metodología, técnica y material, además de que ningún marcador de ADN se considera ideal, con o que su uso depende de los objetivos de la investigación²⁶.

OBJETIVOS

Con este trabajo se ha querido investigar la existencia de adulteraciones en los productos que alegan ser *Cetraria islandica* vendidos en herbolarios españoles de la Comunidad de Madrid. Para ello se han utilizado técnicas de identificación morfológica y cromatográfica, pero sobretudo la identificación molecular código de barras de ADN, en la cual se ha querido profundizar en su conocimiento realizando las técnicas de extracción de ADN, PCR, purificación y secuenciación de marcador ITS de todas las muestras recolectadas.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de líquenes utilizados para este estudio fueron comprados en dos herbolarios de la Comunidad de Madrid. Ambos consistían en dos bolsas cerradas cuyo contenido era la planta desecada. En su exterior se podía leer que se identificaban como liquen de Islandia (Cetraria islandica) y en ambas se expresaba su máxima garantía de pureza y naturalidad del producto, además de cómo conservarlo (la bolsa cerrada y sin exposición a la luz).

Se abrieron ambas y se procedió a la selección de muestras y su observación en el microscopio para determinar sus características morfológicas. Seis muestras (por duplicado de cada morfo-especie) fueron preparadas para la extracción de ADN y la secuenciación del mismo. Código del ADN de las muestras del laboratorio SYSTEMOL de Biología Vegetal II: 5250, 5251, 5252, 5253, 5254, y 5255.

1. Botanicum (Fig. 5): se recogieron cuatro muestras: 5250,5251,52525 y 5253.



Fig.4 Bolsa de Liquen Islandia de la marca Botanicum

2. Herbes del Moli (Fig. 6): se recogieron dos muestras 5254 y 5255.



Fig.5 Bolsa de Cetraria islandica de la marca Herbes del Moli

Tras la recogida de muestras se paso a realizar el test químico con K, C, y PD para la identificación de compuestos químicos. Se colocaron las muestras recogidas en distintos eppendorf y se llevaron al laboratorio con su número de identificación para proceder a la identificación molecular.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se añadió acetona en cada muestra y se dejó durante 2 horas para conseguir la eliminación de metabolitos secundarios, se retiró y se dejó secar durante la noche. Las muestras se colocaron en un mortero estéril y se añadió nitrógeno líquido para congelar la muestra y así hacer más fácil romperla con el mortero, y después se añadió el buffer AP1 de ruptura y Rnase A en solución y se incubo a 65°C durante 2 horas.

Para la extracción del ADN utilizamos el mini kit Dneasy Plant (Qiagen, Valencia, California, USA), del cual se siguieron las instrucciones con alguna pequeña modificación²⁸.

PCR Y ELECTROFORESIS

Se tuvieron que realizar tres ampliaciones PCRs de las regiones ITS usando los primers 1LM y 2KL específicos de hongos. Cada una consistió en poner 6 µl de cada muestra de ADN, más la adicción de un negativo (para reconocer contaminaciones si las hubiera), 1.25 µl de primer y Master Mix, y el resto de µl de agua desionizada hasta un total de 25 µl.

Para todas las electroforesis hicimos un gel de agarosa 1% mediante la mezcla de 45 gramos de agarosa en polvo con 45ml de TAE buffer, que calentamos y mezclamos con 4 µl de SYBR Safe ADN (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) que luego dejamos secar en la placa para que tomara su forma. Tras dejarlo secar se añaden las diferentes muestras junto al colorante azul (loading buffer) en las ranuras del gel, se conecta a la red eléctrica y se deja durante unos minutos. Tras este tiempo se mira en una cámara bajo luz ultravioleta y se fotografían los resultados.

Los PCRs fueron realizados usando dos métodos, uno con Master Mix y los otros dos con PCR Beads. El proceso se detalla a continuación:

- PCR1: En esta primera de utilizo el ADN E2, que es el que tiene menor cantidad de ADN pero más puro. Se mezcló cada muestra con agua desionizada, los primers 1LM y 2KL(reverse primer) y el Master MIX donde se encuentra el buffer, la polimerasa y los Dntps. Muestras: 5250-5251-5252-5253-5254-5255 y un negativo.

DNA E2	6 µl		
Agua desionizada	4 µl	x9	36 µl
Primer 1LM	1.25 µl	x9	11.25 µl
Primer 2KL	1.25 µl	x9	11.25 µl
Master MIX	12.5 µl	x9	112.5 µl

Tras la mezcla se lleva al termociclador Techne R TC-3000 1A donde se aplicó el programa ITS54: un primer calentamiento de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 1.5 min a 72 °C. Se añadió un paso final de extensión de 5 min a 72 °C, y después de esto se dejaron las muestras a 4°C.

Los resultados de la electroforesis de esta PCR fueron negativos.

- PCR BEADS: Este es más potente que el PCR normal y en las muestras antiguas y fragmentada funciona mejor. Los PCR se realizaron usando los mismos primers que en el anterior pero usando ADN E1, que es menos puro pero con mayor cantidad de ADN. Estos resultados de la electroforesis fueron positivos.

Los productos de las PCRs se purificaron mediante el protocolo de kit de purificación de enzimas en el que se toman 10 µl del producto de PCR y se añaden 2 µl de la mezcla de enzimas ExoSAP-IT™ (Exonuclease 1-shrimp alkaline phosphatase). Se agita y se centrifuga (no mucho, solo para que el líquido baje al tubo) y se pone en el termociclador con el programa: 37 °C 15 minutos/ 80°C 30 minutos.

Tras el enfriamiento de las muestras se llevaron al servicio de Secuenciación Sanger de la unidad de genómica de la Facultad de biología en la Universidad Complutense de Madrid (campus Moncloa) para que procedieran con la secuenciación. Ambas cadenas complementarias se secuenciaron utilizando ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) con los mismos primers que se usaron en la ampliación y de la siguiente forma:

desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 25 ciclos a 96 °C durante 10 s, 50 °C durante 5 s and 60 °C durante 4 min. Las reacciones de secuenciación fueron sometidas a electroforesis en un analizador 3730 de DNA (Applied Biosystems)²⁴.

Las secuencias fueran editadas usando el programa SeqMan para comprobar el estado de la secuencia, donde pueden editarse y comprobar si la secuencia es clara y podrá ser identificada o por si por el contrario muchas bases salen como N, es decir inconclusas, o con otras letras que no son las de las bases (G, C, T, A) porque pudieran ser dos de ellas.

Ejemplo de *Cetraria islandica*, muestra 5251, secuencia de muy buena calidad (Fig.6):

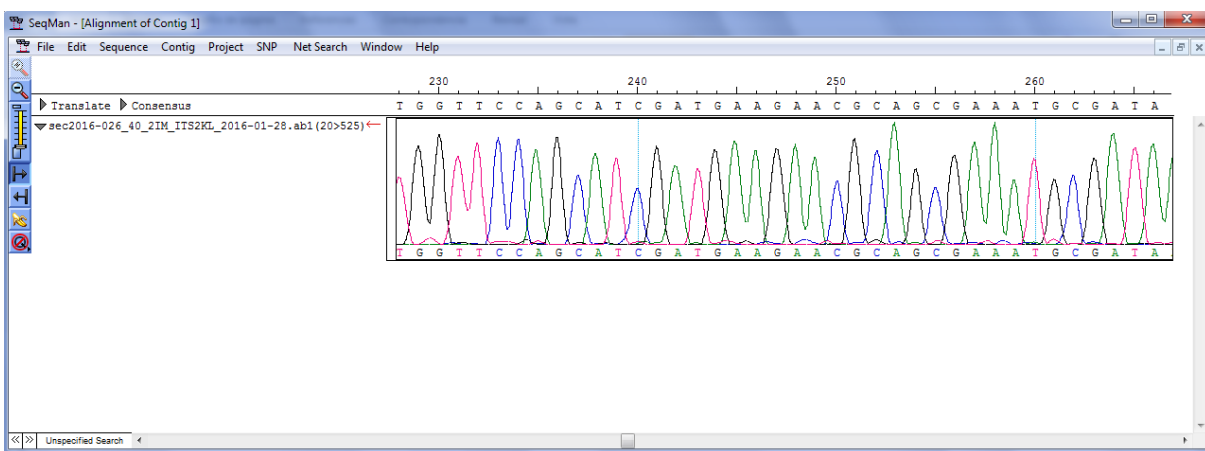


Fig. 6 Secuenciación de la muestra 5251 de *Cetraria* islandica

Ejemplo de *Pseudevernia furfurácea*, muestra 5253, secuencia de muy baja calidad (Fig.7):

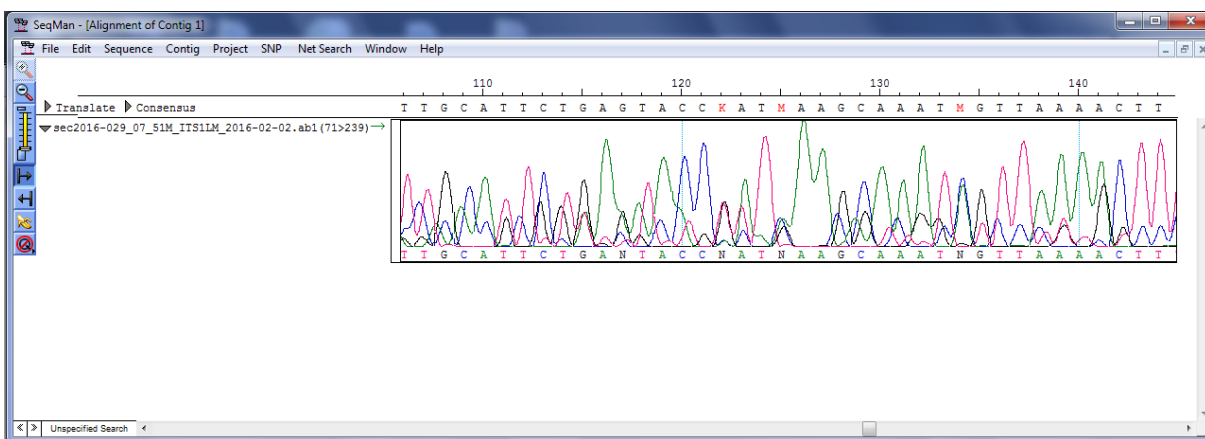


Fig.7 Secuenciación de la muestra 5253 de *Pseudevernia furfurácea*

Tras la comprobación y edición, se uso la base de datos de Barcode of Life Data System (BOLD System web [www.bolystems.org](http://www.bolsystems.org).) para la identificación molecular de las muestras, donde

se introdujeron las secuencias de ITS en formato fas en la pestaña de identificación para hongos y se observaron los resultados.

RESULTADOS

Estudios morfológicos:

1. Botanicum:

- 5250 y 5251: Ambas muestras se identificaron como *Pseudevernia furfurácea* por su color marrón y negro y tener isidios en su superficie. Es una especie muy común en España incluso se puede encontrar en parques en Comunidad de Madrid.
- 5252 y 5253: eran muestras de líquenes marrones-verdosos con pseudofilos y soraliós en los márgenes característico de *Cetraria islandica*. La 5252 era de un color marrón más oscuro que la 5253.

- #### 2. Herbes del Moli:
- Las dos muestras 5254 y 5255 consistían en los mismos líquenes verdes lobulados que fueron identificadas como *Cladonia foliacea*. También se detectó un aroma posiblemente de una labiada, no típico de un líquen.

Estudio Molecular:

En total de seis muestras extraídas cinco se amplificaron. Se encontraron dos muestras con productos de PCR en la primera (5252,5254 Fig. 8) y tres muestras en la segunda (5251, 5253,5255 Fig. 9) con el método PCR BEADS, mientras que el método PCR normal fracasó.

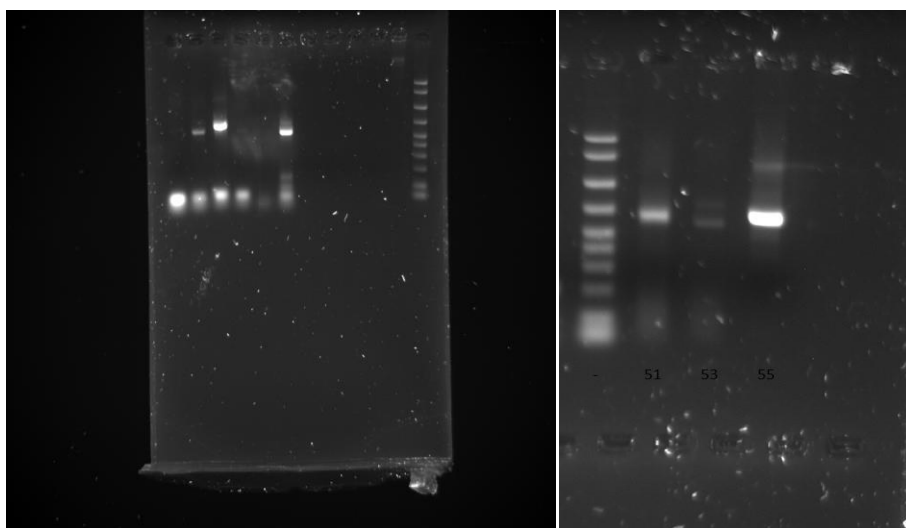


Fig.8 segunda electroforesis con muestras con ADN 5252,5254 .Fig.9 tercera electroforesis con muestras de ADN de 5251,5253 ,5255.

Identificación mediante BOLD System:

Los resultados de cada secuencia obtenida de las muestras fueron:

- 5251: Esta muestra cuando se secuenció por primera vez con los primers reverse no dio resultados legibles. Se volvió a realizar una secuenciación esta vez con primers forward que dio como resultado una secuencia de 160 pares de bases, que son consideradas pocas para una correcta identificación. Además de esto, la calidad de la secuencia era mala, pues había muchas bases no identificadas, por lo que los resultados que se obtuvieron en Bold system con una probabilidad del 90% no pueden ser considerados válidos.
- 5252: *Cetraria islandica* con un 99.6% de similaridad a la secuencia de la base de datos (Fig. 10).

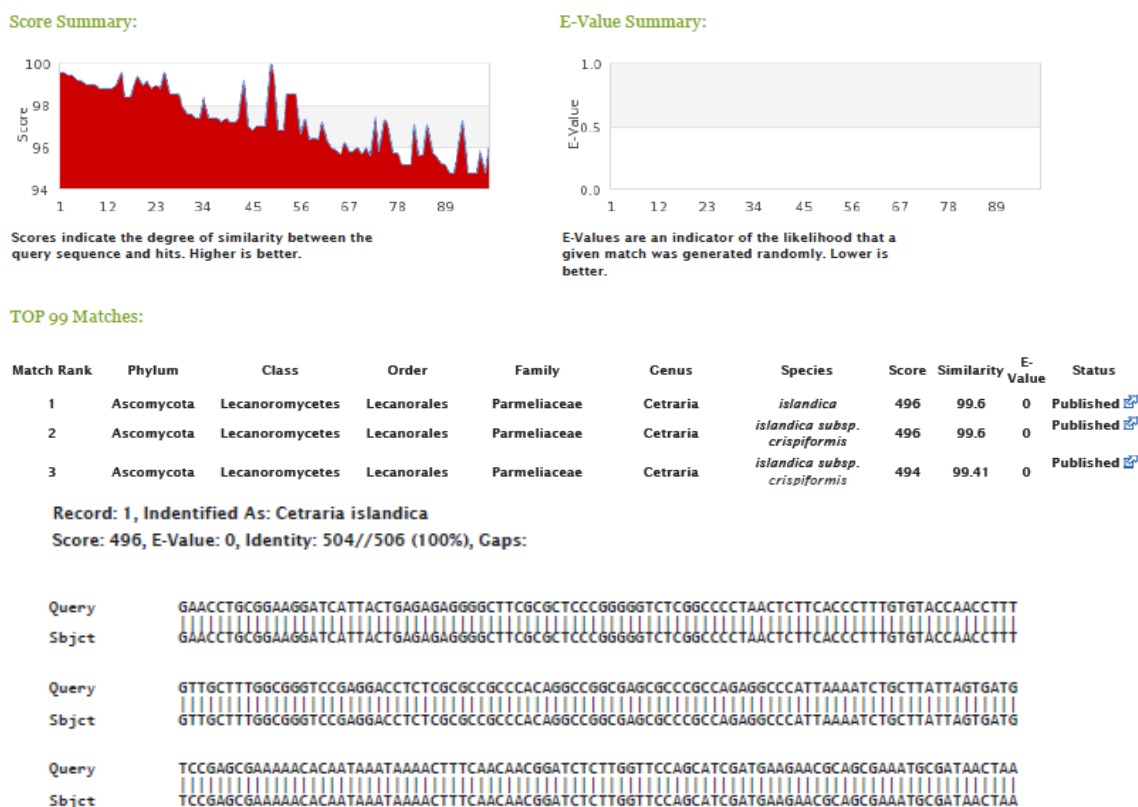
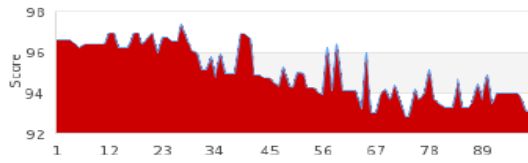


Fig.10 Resultados Bold system de la muestra 5252

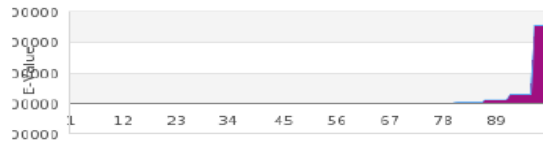
- 5253: *Cetraria ericetorum* con un 96,63 % de similaridad (Fig.11). Usando caracteres morfológicos las dos muestras 5252 y 5253 fueron identificadas como *Cetraria islandica*.

Score Summary:



Scores indicate the degree of similarity between the query sequence and hits. Higher is better.

E-Value Summary:



E-Values are an indicator of the likelihood that a given match was generated randomly. Lower is better.

TOP 99 Matches:

Match Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity	E-Value	Status
1	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Parmeliaceae	Cetraria	<i>ericetorum subsp. reticulata</i>	420	96.63	0	Published ↗
2	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Parmeliaceae	Cetraria	<i>islandica</i>	419	96.62	0	Published ↗
3	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Parmeliaceae	Cetraria	<i>islandica subsp. crispiformis</i>	419	96.62	0	Published ↗

Record: 1, Identified As: *Cetraria ericetorum subsp. reticulata*
 Score: 420, E-Value: 0, Identity: 459//475 (97%), Gaps:

```

Query      TGAACCTGCCGAAAGGATCATTACTGAGAGAGGGGCTTCGCGCTCCCGGGGGCTCTCGGCCCTAACTCTTCAACCTTTGTGTACCAACT
Sbjct     TGAACCTG-CGGAAAGGATCATTACTGAGAGAGGGGCTTCGCGCTCCCGGGGGCTCTCGGCCCTAACTCTTCAACCTTTGTGTACCAACT

Query      TTGTTGCTTTGGCGGGTCCGAGSACCTCTCGCGCCGCCACAGGCCGCGGAGCGCCGCCAGAGGCCATTAAAACTGCTATCAGT-A
Sbjct     TTGTTGCTTTGGCGGGTCCGAGSACCTCTCGCGCCGCCACAGGCCGCGGAGCGCCGCCAGAGGCCATTAAAACTGCTATTAGTGA

Query      TGTCCGAGCGAAAAAACAATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACT
Sbjct     CGTCCGAGCGAAAAACACAATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACT

Query      AATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATYGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTTCGAGCGTC
Sbjct     AATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTTCGAGCGTC

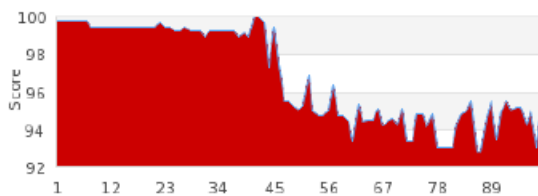
Query      ATTATACCTTCAAGCGTAGCTTGGTATTGGGCTCGCCCCCGTGGCGTCCGAAAAGACAAGTGGCGTTCCGGGGCGACTTTAAGC
Sbjct     ATTATACCTTCAAGCGTAGCTTGGTATTGGGCTCGCCCCCGTGGCGTCCGAAAAGC--AGTGGCGT-CCGGGGCGACTTTAAGC

Query      CGTATGTAAAAATTATCCAGCCTTTG
Sbjct     -GCA-GTAAAAATTATCC-CGCTTTG
    
```

Fig.11 Resultados Bold system de la muestra 5253

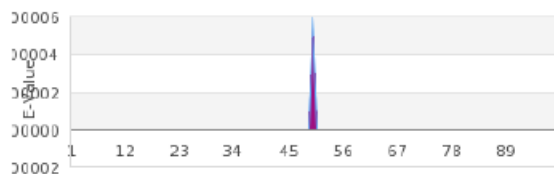
- 5254: *Cladonia convoluta* con un 99,74 % de similaridad (Fig.10).

Score Summary:



Scores indicate the degree of similarity between the query sequence and hits. Higher is better.

E-Value Summary:



E-Values are an indicator of the likelihood that a given match was generated randomly. Lower is better.

TOP 99 Matches:

Match Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity	E-Value	Status
1	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	376	99.74	7.1885748841714E-164	Published ↗
2	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	376	99.74	7.1885748841714E-164	Published ↗
3	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	376	99.74	7.1885748841714E-164	Published ↗

Record: 1, Identified As: *Cladonia convoluta*
 Score: 376, E-Value: 7.1885748841714e-164, Identity: 377//378 (100%), Gaps:

```

Query      TGAACCTGCGGAAGNATCATTAAATGAGTTAAGGAGGCTA6CCCCA6C6GCGA6TG6C6G6CCGAGTCCCCGGGGCTCG6CC6G6CTTCG
Sbjct     TGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAGTTAAGGAGGCTA6CCCCA6C6GCGA6TG6C6G6CCGAGTCCCCGGGGCTCG6CC6G6CTTCG

Query      CCGTGTTCCTCA6CCCCATGTTTACCATACTTTGTTGCTTTG6C6G6CCTT6AGTA6GCTATAC6GCTCATGCCA6CCCCA6GCTTCA
Sbjct     CCGTGTTCCTCA6CCCCATGTTTACCATACTTTGTTGCTTTG6C6G6CCTT6AGTA6GCTATAC6GCTCATGCCA6CCCCA6GCTTCA

Query      TTGCCTGGGGGCGCTCG6CCCCGCCA6AGGTATAACCAAACTCTATTATCA6TGATGTCTGAGCAAAATATTAATAATCAAACCTT
Sbjct     TTGCCTGGGGGCGCTCG6CCCCGCCA6AGGTATAACCAAACTCTATTATCA6TGATGTCTGAGCAAAATATTAATAATCAAACCTT

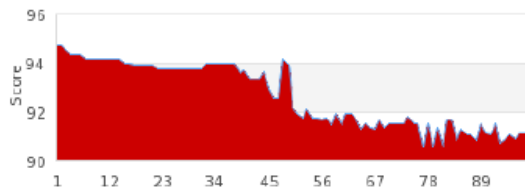
Query      CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA6CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA6AATTCA6TGAATCATCGAA
Sbjct     CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA6CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA6AATTCA6TGAATCATCGAA

Query      TCTTTGAACGCACATTGC
Sbjct     TCTTTGAACGCACATTGC
  
```

Fig.12 Resultados Bold system de la muestra 5254

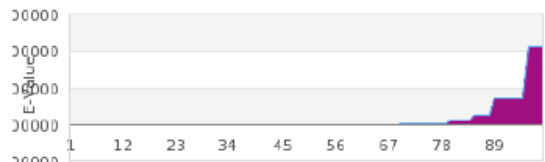
- 5255: *Cladonia convoluta* con un 94,77% de similaridad (Fig.11).

Score Summary:



Scores indicate the degree of similarity between the query sequence and hits. Higher is better.

E-Value Summary:



E-Values are an indicator of the likelihood that a given match was generated randomly. Lower is better.

TOP 99 Matches:

Match Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity	E-Value	Status
1	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	439	94.77	0	Published ↗
2	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	439	94.77	0	Published ↗
3	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	Cladonia	<i>convoluta</i>	438	94.58	0	Published ↗

Record: 1, Identified As: *Cladonia convoluta*
 Score: 439, E-Value: 0, Identity: 471//497 (95%), Gaps:

```

Query      TTTCTCA6CCCCATGTTTACCGTACCTTTGTTGCTTTG6C6G6CCTT6AGTA6GCTATAC6GCTCATGCC6CCCCAAGHTTCATTGCCT
Sbjct     TTTCTCA6CCCCATGTTTACCGTACCTTTGTTGCTTTG6C6G6CCTT6AGTA6GCTATAC6GCTCATGCC6CCCCAAGHTTCATTGCCT

Query      GGGGGGCGCTCG6CCCCGCCA6AGGTAAAAACCAAACTCTATTATCA6TGATGTCTGAGCAAAATATTAATAATCAAACCTTCAAACAA
Sbjct     GGGGGGCGTTG6CCCCGCCA6AGGTAAAAACCAAACTCTATTATCA6TGATGTCTGAGCAAAATATTAATAATCAAACCTTCAAACAA

Query      CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA6CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA6AATTCA6TGAATCATCGAATCTTYG
Sbjct     CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA6CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA6AATTCA6TGAATCATCGAATCTTYG

Query      AACGCACATTG6CCCCCTCG6TATTC6GGGGGGCWY6CCYGTTC6A6C6TCAATACACCCCTCAAGCATAGCTTGGATTGGATTTTYAGC
Sbjct     AACGCACATTG6CCCCCTCG6TATTC6GGGGGGCATGCTGTTG6A6C6TCAATACACCCCTCAAGCATAGCTTGGATTGGATTTTYAGC

Query      GGGCTSTATTATAAGGA6GCGCYCG6GGTCC6AAWAGCAC6TG6C6G6TCCCTMGAGGATTTCC6GCTGTA6TAAATAYATATGCC6CG
Sbjct     GGGCTCTCTTATAAGGA6GCGCTCG6GGTCC6AAWAGCA-6TG6C6G6TCCCTMGAGGATTTCC6GCTGTA6TAAATAYATATGCC6CG

Query      TTGGAAAAGTCSGTGGGCTNGCCAAAASCCCCATA-TCTCCAAA
Sbjct     TTGGAAAAGTCSGTGGGCTTGC AAAACCCCCAATAATCTCCAAA
  
```

Fig.13 Resultados Bold system de la muestra 5255

DISCUSION

Tras estos resultados se comprueba que en la bolsa de la marca Botanicum en la que veíamos escrito que el contenido era Liquen Islandica nos encontramos con *Cetraria islandica*, *Cetraria ericetorum* y *Pseudovernia furfuracea* (identificada morfológicamente y cromatográficamente), y en la bolsa Herbes del Moli no hay ni siquiera *Cetraria islandica*, si no que toda ella es *Cladonia convoluta*. Con lo que en estas dos marcas se está produciendo adulteración de plantas medicinales. Se observó que en la marca Botanicum puede haber solo un 20% de *Cetraria islandica* de la muestra total, y más del 50% eran los materiales de *Pseudevernia furfurácea*, que es una especie muy común en España e incluso se puede encontrar en los parques de la Comunidad de Madrid. En la bolsa Herbes del Moli 100% de las muestras resultaron ser *Cladonia convoluta*, otra especie muy común en la Península Ibérica.

Esta práctica seguramente será debida a la facilidad de recolección de algunos de estos líquenes que podemos encontrar en lugares más accesibles que *Cetraia Islandica*, ya que en España solo se encuentra en zonas montañosas del norte del país, pero se trata de una práctica muy peligrosa ya que algunos líquenes son conocidos por tener metabolitos secundarios que pueden provocar intoxicaciones y en algunos casos la muerte. Es el caso de el ácido úsnico, que está presente en los líquenes como *Cladonia convoluta* encontrada en la bolsa de Harbes de Moli, y puede resultar tóxico en altas dosis, como en el periodo entre febrero y abril de 2004, cuando cientos de alces fueron encontrados muertos en el estado de Wyoming (Estados Unidos) donde la causa de su muerte fue el consumo del liquen tóxico *Xanthoparmelia chlorochroa* (Tuck.) Hale³⁰. Muchas especies son amargas e irritan el tracto digestivo, otras son tóxicas, debido a ciertos ácidos liquénicos, por ejemplo, su contenido en ácido vulpínico es la causa de que *Letharia vulpina* (L.) Hue, un líquen presente en Canadá, sea una especie venenosa³¹. Por lo que estas adulteraciones no se debían tomar a la ligera.

Se ha podido comprobar en este estudio que efectivamente como se vio en el estudio de identificación de *Parmeliaceae* por ADN barcoding²⁴, la identificación molecular en líquenes es muy útil, ya que de las cuatro muestras que han podido secuenciarse, tres habían sido identificadas morfológicamente como otra especie. Esto no hace más que añadirle valor a esta técnica que aparte de servir para la identificación de muestras, está ayudando a encontrar la relación filogenética de unos y otros líquenes, pudiendo descubrir casos en los que líquenes prácticamente iguales morfológicamente tienen un ADN muy diverso y están muy separados evolutivamente unos de otros¹.

Pero este estudio también ha servido para ver las limitaciones, pues en el ADN barcoding influye muy ampliamente la calidad del ADN que hayas obtenido mediante la ampliación, ya que las secuencias que se consideran características deberían de tener más de 500 pares de bases para producir una identificación certera²⁶. Este ha sido el caso de *Pseudevernia furfurácea*, la cual no pudimos identificar correctamente, pues solo obtuvimos 160 pares de bases, de manera que las similitudes no eran del todo certeras. Esto ha podido ser por la calidad del ADN de la muestra, que al estar desecada pudo haberse degradado o que al hacer la técnica de ampliación o extracción hubo que haber hecho alguna variación en el proceso.

Debido al obvio fraude que se puede realizar con las plantas medicinales, creo que se debería revisar la legislación tanto Europea como Española. En la Ley 29/2006, del 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios con la última modificación del 25 de julio de 2015 en el artículo 51³² lo que se dice de las plantas medicinales es:

1. Las plantas y sus mezclas, así como los preparados obtenidos de plantas en forma de extractos, liofilizados, destilados, tinturas, cocimientos o cualquier otra preparación galénica que se presente con utilidad terapéutica, diagnóstica o preventiva seguirán el régimen de las fórmulas magistrales, preparados oficinales o medicamentos industriales, según proceda y con las especificidades que reglamentariamente se establezcan.
2. El Ministerio de Sanidad y Consumo establecerá una lista de plantas cuya venta al público estará restringida o prohibida por razón de su toxicidad.
3. Podrán venderse libremente al público las plantas tradicionalmente consideradas como medicinales y que se ofrezcan sin referencia a propiedades terapéuticas, diagnósticas o preventivas, quedando prohibida su venta ambulante.

Como se puede comprobar en el tercer punto, no existe una verdadera regulación, pues se pueden vender las plantas medicinales de forma libre con tal de que no pongas sus propiedades terapéuticas, diagnósticas y preventivas, tal y como ha sido el caso de nuestras dos bolsas de muestras. Debido a que no hay una regulación en esto, no hay un control sobre la autenticidad de las plantas, y por tanto, el riesgo de falsificaciones o adulteraciones en este campo aumenta, no solo en líquenes, sino en cualquier tipo de planta medicinal.

A este peligro se añade el hecho de que el sector de plantas medicinales de venta en herbolarios o grandes superficies crece cada día, produciéndose una explosión en el mercado con tasas de crecimiento de alrededor del 15% anual continuadamente durante prácticamente diez años, alcanzándose en el año 2004 unas ventas en torno a los 250 millones de euros, según estimaciones de la FEFE (Federación Empresarial de Farmacéuticos Españoles). Otra característica propia del mercado español es la distribución, todavía mayoritaria, a través de herbolarios (c. 60%), frente a la distribución a través de oficinas de farmacia (c. 40%), datos de la Asociación Española de Especialidades Farmacéuticas Publicitarias, (ANEPPF), en contraste con la realidad europea, donde, en promedio, el 80% se distribuye a través de canales farmacéuticos y sólo un 20% a través de otras vías³³.

CONCLUSIONES

Se han detectado adulteraciones en las muestras recogidas de dos marcas en dos herbolarios de la Comunidad de Madrid que decían ser *Cetraria Islandica* en ambos envoltorios:

- Botanicum: contenía tres especies *Cetraria Islandica*, *Cetraria ericetorum* y *Pseudevernia Furfurácea*.
- Herbes del Moli: contenía una especie solamente, *Cladonia Convoluta*.

Estas identificaciones han sido posibles gracias a la técnica de ADN barcoding, que ha demostrado ser más eficaz que la técnica morfológica, pues muestras que se creyeron que eran una especie tras la secuenciación se detectó que eran otra.

BIBLIOGRAFIA

1. P. K. Divakar et al., Evolution of complex symbiotic relationships in a morphologically derived family of lichen-forming fungi, *New phytologist*, 2015, 5-7.
2. E. Barreno and S. Perez-Ortega, *Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias*, KRK Ediciones, 2003, 147-240.
3. S. Nayaka, D.K. Upreti and R. Khare, Medicinal lichens of India. In *Drugs from Plants* (Ed. P.C. Trivedi), Avishkar Publishers, 2010, 6-8.
4. G. Renobales and J. Sallés, *Plantas de interés farmacéutico, Cetraria islandica*, 2001.

5. K.O. Vartia, Antibiotics in lichens. In *The Lichens* (Eds. Ahmadjian, V. and Hale, M.E.), Academic Press. New York and London, 1973, 547-561.
6. R. Novaretti, D. Lemordant, Plants in the traditional medicine of the Ubaye Valley, *J.Ethnopharmacology*, 1990, 30, 1-34.
7. V. Ahmadjian, S. Nilsson, Swedish lichens. In *Yearbook. American Swedish Historical Foundation*, 1963.
8. L.C. Lokar, L. Poldini, Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (north east Italy), *J. Ethnopharmacology*, 1988, 22, 231-278.
9. J. Lindley, *Medical and economical botany*, Bradbury and Evans, London, 1849.
10. A. Chevallier, *The Encyclopedia of Medicinal Plants*, Dorling Kindersley, London, 1996.
11. G.A. Perez-Llano, Lichens. Their biological and economic significance, *Bot. Rev.*, 1944, 10, 1-65.
12. G.A. LLano, Economic uses of lichens. *Econ. Bot.*, 1948, 2, 15-45.
13. M.M. Airaksinen et al., Toxicity of plant material used as emergency food during famines in Finland, *J. Ethnopharmacology*, 1986, 18, 273-296.
14. M.E. Hale, *The biology of lichens*, Edward Arnold Ltd. London, 1967.
15. D.H.S. Richardson, Lichens and man. In *Frontiers in Mycology* (Ed. Hawksworth, D.L.). CAB International, Wallingford, 1991, 187-210.
16. D. Bown, *Encyclopedia of Herbs and their Uses*, Dorling Kindersley, London, 2001.
17. R. Rogers, *Medicinal Lichens* http://www.wildmushrooms.ws/c/document_library/get_file?uuid=3e2830ba-bc55-4385-869e-f5278c33a7d3&groupId=10128
18. E. Kotan, L. Alpsoy, M. Anar, A. Aslan and G. Agar, Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB1 in human lymphocytes in vitro, *Toxicol. Ind. Health*, 2011, 27, 599–605.
19. I.Gülçin, M. Oktay, O. I. Küfreviöglu and A. Aslan, Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach, *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 79, 325–329.
20. C. Kempe, H. Grüning, N. Stasche and K. Hörmann, Icelandic moss lozenges in the prevention or treatment of oral mucosa irritation and dried out throat mucosa, *Laryngol., Rhinol., Otol.*, 1997, 76, 186–188.
21. J. Freysdottir et al., In vitro and in vivo immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica*, *Int. Immunopharmacol.*, 2008, 8, 423–430.

22. G. Y. Deniz, F. Geyikoglu, H. Türkez, T. O. Bakir, S. Colak and A. Aslan, The biochemical and histological effects of lichens in normal and diabetic rats, *Toxicol. Ind. Health*, 2013, DOI: 10.1177/0748233713506769.
23. F. Bucar et al., Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets, *Phytomedicine*, 2004, 11, 602–606.
24. P. K. Divakar et al., A DNA barcoding approach for identification of hidden diversity in Parmeliaceae (Ascomycota): *Parmelia sensu stricto* as a case study, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 1.
25. P. D.N. Hebert et al., Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Royal society*, 2003.
26. S. H. Ganie, P. Upadhyay, S. Das, M. P. Sharma Authentication of medicinal plants by DNA markers, Elsevier B.V., 2015, 84-85.
27. CBOL, Plant working group a DNA barcode for land plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, 12794–12797.
28. CL Schoch et al., Fungal Barcoding Consortium, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer(ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 2012, 109, 6241–6246.
29. A. Crespo, O. Blanco, DL. Hawksworth, The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens, *Taxon*, 2001, 50, 807–819.
30. W.E Cook, M.F. Raisbeck, T.E. Cornish, E.S. Williams, B. Brown, G. Hiatt and T.J. Kreeger, Paresis and death in elk (*Cervus elaphus*) due to lichen intoxication in Wyoming. *J. Wildlife Dis*, 2007, 43(3), 498-503.
31. C. Illana-Esteban, Líquenes Comestibles, *Bol. Soc. Micol.*, Madrid, 2009, 33, 273-282.
32. Boletín Oficial del Estado. Ley 29/2006, de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, BOE 178, de 26 de julio de 2006
33. C. Blanché, Situación actual del sector de las plantas medicinales en España. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* , 2005, 52, 451-452.