



FIGURA 1. *Crataegus monogyna*. Foto: Bernat Vanaclocha.

## Futuro en la investigación en Fitoterapia: tendencias y retos

Hildebert Wagner

Zentrum für Pharmaforschung, Universität München

### Abstract

The need of safer and more effective medicines, with a scientifically rationalized use in therapy, the need of drug innovation and of new causality-based treatments for those diseases that still lack it, the increasing interest for the possibilities of polytherapy in front of the usual monotherapy, and for multi-target treatments will determine to a large degree the content and strategies of future research in Phytotherapy. Four major research areas will have a particular priority in the near future:

- The high-tech methods for the chemical analysis of plant extracts and standardization.
- The search for bioactive constituents in plants for the development of new drugs.
- The integration of new molecular biological methods into the screening of plant extracts and their constituents.
- The good clinical practice-conform studies of the efficacy proof and bioavailability of standardized plant extracts.

### Key words

Phytotherapy, phytomedicine, research, quality, efficacy, clinical trials, bioavailability, molecular biology.

### Resumen

La necesidad de disponer de medicamentos cada vez más seguros y eficaces, cuyo uso en terapéutica sea racional desde el punto de vista científico, la necesidad de innovación farmacológica y de nuevos tratamientos etiológicos para enfermedades que todavía no disponen de él, así como el creciente interés por las posibilidades de la politerapia frente a la monoterapia y por los tratamientos multidiana, determinarán, en gran medida, el contenido y estrategias de la futura investigación en Fitoterapia. Cuatro áreas de investigación aparecen como particularmente importantes en el próximo futuro:

- Los métodos de alta tecnología para el análisis químico y estandarización de los extractos vegetales.
- La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos para el desarrollo de medicamentos.
- La integración de los nuevos métodos de biología molecular para el tamizado farmacológico de plantas y sus constituyentes.
- El desarrollo de estudios clínicos bien protocolizados y de ensayos de biodisponibilidad de los extractos vegetales estandarizados.

### Palabras clave

Fitoterapia, fitomedicina, investigación, calidad, eficacia, ensayos clínicos, biodisponibilidad, biología molecular.



## Introducción

Para poder definir y describir las futuras tareas de la investigación en Fitoterapia o Fitomedicina es necesario realizar un análisis previo no sólo del estado actual del desarrollo de la investigación fitoterápica sino también del de la investigación en fármacos de síntesis. Ambas áreas tienen en común la búsqueda de nuevos medicamentos con pocos o nulos efectos secundarios, que sean útiles para la prevención y tratamiento de patologías, especialmente de aquellas para las que no existe tratamiento etiológico o bien es mejorable.

Por un lado, este análisis es obligado para mejorar la terapéutica. Por otro, debemos tener en cuenta lo que las regulaciones legales sobre medicamentos estipulan para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos que se desarrollen. A pesar de las diferencias normativas entre los países occidentales y las de los países en vías de desarrollo o los asiáticos, existe un consenso general al menos en dos puntos: que los medicamentos deben ser cada vez más seguros y eficaces y que su uso en terapéutica debe ser racional desde el punto de vista científico. Estas premisas serán determinantes, en gran medida, del contenido y estrategias de la futura investigación en Fitoterapia. La necesidad de innovación resulta también favorable a una revitalización en este campo.

De las dos mil enfermedades agudas y crónicas registradas, solo un 30% son curables en la actualidad. El resto son tratadas sólo de forma sintomática, con mayor o menor eficacia. Por tanto, existe una necesidad de nuevos tratamientos altamente eficaces, de carácter etiológico, a los cuales la investigación en Fitoterapia puede contribuir. Una de las ventajas de la Fitoterapia es que puede aportar un elevado número de drogas vegetales y preparaciones que han sido empleadas de forma empírica durante siglos. La avanzada tecnología actual permite a los investigadores optimizar la eficacia, la normalización y la valoración clínica de estos medicamentos de uso tradicional para alcanzar los estándares internacionales actuales. Además, existe un reservorio de unas 300.000 especies vegetales de las que sólo un 30% de ellas han sido investigadas de forma científica, incluidas las plantas medicinales y preparaciones de las medicinas tradicionales de China, India, Sudamérica y África.

Las técnicas actuales de tamizado farmacológico (*high throughput screening*) permiten estudiar miles

de extractos y materiales vegetales, empleando diversos modelos, en un periodo relativamente breve, seguido por el aislamiento y determinación estructural de todos los principios activos, incluso si están presentes en pequeñas cantidades.

Estos procedimientos analíticos se pueden completar actualmente con ensayos de biología molecular, recientemente introducidos en las técnicas de tamizado farmacológico de plantas, que permiten determinar, a nivel molecular, mecanismos de acción hasta ahora desconocidos de un extracto o material vegetal, así como facilitar el descubrimiento de nuevas indicaciones que permitan tratamientos etiológicos. Los modelos de la biología molecular pueden también ayudar a explicar los efectos sinérgicos entre los componentes de los extractos.

Gracias al empleo de estas técnicas en el estudio químico y farmacológico de los preparados a base de plantas, los investigadores pueden presentar resultados clínicos reproducibles e internacionalmente reconocidos. Se han presentado más de 400 estudios clínicos aleatorizados, a doble ciego, controlados con placebo, con resultados positivos, realizados con unos veinte preparados fitoterápicos estandarizados. Estos resultados evidencian la conveniencia de dar prioridad al desarrollo de nuevos medicamentos fitoterápicos en un futuro próximo.

Dos cambios paradigmáticos, ejemplificados por la evolución de las estrategias farmacoterapéuticas, sirve como confirmación adicional y legitimación de la investigación fitoterápica: la renuncia gradual a la confianza que se ha tenido durante mucho tiempo en la monoterapia como tratamiento ideal en favor de la politerapia, y el desarrollo de conceptos de aplicación totalmente nuevos en los se da mayor importancia a la evaluación de diferentes procesos fisiopatológicos y síntomas acompañantes, frente a la investigación de agentes etiológicos específicos sobre una única diana farmacológica (por ejemplo, células tumorales o infección).

La Fitoterapia ha seguido y desarrollado ampliamente ambas estrategias, aunque con limitaciones en lo que se refiere al soporte directo por evidencias científicas. Actualmente, resulta que las estrategias terapéuticas de la Fitoterapia y la terapia de síntesis son confluentes. Desde 1985 se han publicado numerosos libros y revisiones, que ofrecen una panorámica del estado de la investigación en Fitoterapia, sus tareas y sus métodos<sup>(1-9)</sup>.



En los siguientes apartados se presentan, a partir de ejemplos derivados de nuestra investigación y la de otros grupos, el avance en los conocimientos sobre Fitoterapia, así como resultados relevantes de los tres principales aspectos de la investigación fitoterápica, que en nuestra opinión seguirán considerándose prioritarios en los próximos diez años:

- Asegurar la calidad de los fitopreparados por medio de la estandarización.
- La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.
- La investigación farmacológica y biológico-molecular y el desarrollo de estudios clínicos, farmacocinéticos y de biodisponibilidad.

La seguridad es el requisito más importante para el desarrollo de nuevos fitopreparados y debe estar garantizada por estudios toxicológicos. Estas tareas solo pueden llevarse a cabo a través de la colaboración multidisciplinar y la cooperación internacional.

### Garantía de calidad de los medicamentos a base de drogas vegetales y fitopreparados

La mayoría de estados han desarrollado organismos para el control de calidad de fitopreparados destinados al mercado interno o de exportación. Los medicamentos reconocidos oficialmente están sujetos a ensayos y especificaciones de identidad, pureza y contenido de los principales constituyentes activos o marcadores para cada droga vegetal, a la garantía de conservación de la especie, y a especificaciones de pureza microbiológica. Actualmente, los requisitos de calidad de las diferentes farmacopeas nacionales varían de unos países a otros, sin embargo la Federación Internacional de Asociaciones de Fabricantes de Medicamentos (*International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations*, IFPMA) ha dado un primer paso hacia la implantación a nivel global de criterios armonizados <sup>(10)</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha efectuado una revisión de la situación legal de las medicinas tradicionales y de las terapias complementarias o "alternativas" en 123 países <sup>(11)</sup>.

Además, algunos países y organizaciones han elaborado o están elaborando sus propias monografías, como por ejemplo la Comisión E del ministerio de sanidad alemán, la OMS, ESCOP (*European Scientific Cooperative on Phytotherapy*) <sup>(12-17)</sup>, China o Brasil. Estas monografías recogen los estándares de calidad aplicables a las drogas y fitopreparados del mercado farmacéutico.

La garantía de calidad de una droga vegetal empieza por la correcta identificación taxonómica. Este punto puede presentar dificultades, incluso para los expertos en botánica debido a la enorme variabilidad dentro de determinados géneros y las variaciones inter o intraespecíficas (polimorfismo). Como consecuencia de ello se han producido no pocos errores de identificación. Este problema puede resolverse utilizando la nueva aproximación molecular de análisis del ADN, especialmente las técnicas de secuenciación genética y análisis de restricción (RELPs) combinadas con la investigación micromorfológica <sup>(18-19)</sup>. Este método requiere una cantidad relativamente reducida de material vegetal, usando marcadores moleculares independientes de ADN nuclear o cloroplástico aislado. Las secuencias son transferibles, editables y analizables por medio de programas informáticos que reconstruyen las relaciones filogenéticas y las similitudes genéticas.

Por este método es posible resolver, por ejemplo, las continuas dificultades que ha habido para la correcta identificación taxonómica de *Phyllanthus amarus* y *P. niruri*. A partir del análisis secuencial de dos marcadores independientes de *P. amarus*, *P. niruri* y ocho especies taxonómicamente cercanas, fue posible caracterizar *P. amarus* por mutaciones específicas de especie. Además, a partir de análisis cladístico, existen evidencias de que *P. fratemus* y *P. abnormis* son especies próximas a *P. amarus*. El análisis reveló además que *P. niruri* no está relacionado genéticamente con *P. amarus*, y que *P. debilis*, *P. tenellus*, y *P. urinaria* son especies claramente diferentes. <sup>(20)</sup>

En los últimos 15 años se han efectuado análisis de DNA de numerosas especies de difícil clasificación taxonómica. Dado que este método se ha convertido en una herramienta analítica habitual, es posible que en el futuro las autoridades reguladoras exijan este tipo de análisis como garantía de correcta identificación para las drogas vegetales cuya clasificación taxonómica pueda presentar dificultades. El mismo sistema se podría aplicar a la demostración de la identidad de nuevas plantas producidas artificialmente por hibridación con una composición química y eficacia terapéutica extraordinarias o a nuevas especies naturales, subespecies, subvariedades o quimiotipos que sean susceptibles de ser protegidas por una patente.

Para desarrollar un nuevo fitopreparado que cumpla los requisitos internacionales actuales de calidad,



seguridad y eficacia a partir de una droga vegetal de la medicina tradicional con una gran reputación popular y un largo tiempo de uso reconocido, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Aislamiento y elucidación estructural de los constituyentes químicos mayoritarios que puedan ser responsables de su actividad farmacológica y eficacia terapéutica. Esto puede llevarse a cabo con o sin fraccionamiento biodirigido, usando las modernas técnicas cromatográficas y espectroscópicas disponibles <sup>(21-22)</sup>. Los métodos más importantes se citan en la TABLA 1. Se han conseguido importantes avances en este área por medio de la aplicación de métodos de análisis selectivos y específicos, usando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinado con la detección por espectroscopía ultravioleta (UV) con barrido de diodos (*Diode-Array Detector*, DAD), espectrometría de masas (MS) o resonancia magnética nuclear (RMN). Por lo que se refiere a los ensayos farmacológicos *in vitro*, además de los métodos enzimáticos, un cada vez mayor número de ensayos de biología molecular se han integrado al estudio de extractos y compuestos aislados.

2. La identificación de los principales constituyentes activos tiene como objetivo primario la estandarización de un extracto o fitopreparado. Dado que diferentes compuestos pueden contribuir a las acciones farmacológicas y efectos terapéuticos globales de un extracto, la cuantificación de un marcador o un grupo de compuestos, de acuerdo con la farmacopea o monografía nacional, puede no ser suficiente. En estos casos el método de estandarización debe ir dirigido a la cuantificación de los dos o tres compuestos bioactivos más importantes según las investigaciones farmacológicas. <sup>(23)</sup>

3. La estandarización de un fitopreparado puede verse dificultada y complicada cuando se trata de una mezcla de extractos. Para superar esta dificultad pueden seguirse dos procedimientos: estandarizar o registrar el perfil cromatográfico de los extractos individuales antes de ser mezclados, o realizar una HPLC tridimensional de la mezcla de extractos, como se ejemplifica en la figura 2 para el fitopreparado Sho-seiryu-to (TJ-19) de la medicina Kampo, que contiene ocho extractos <sup>(24)</sup>. En cualquier caso, sin embargo, el conocimiento de todos los principales componentes bioactivos de las drogas vegetales es una condición previa indispensable. Desde 1995 se han desarrollado multitud de perfiles por

HPLC con cuantificación de los componentes bioactivos de mezclas multiextractos. Bauer y Tittel han propuesto guías generales para la caracterización y estandarización de materias vegetales utilizadas para estudios farmacológicos, clínicos o toxicológicos, con ejemplos para tres categorías de preparados fitoterápicos. <sup>(25)</sup>

4. Dado que los criterios de calidad de las drogas vegetales difiere de unos países a otros, es necesaria la armonización global de los procedimientos, como los establecidos por la IFPMA <sup>(10)</sup>, organización cuyo objetivo es garantizar, a nivel mundial, la regularización de la seguridad, calidad y eficacia de los nuevos medicamentos y facilitar su registro. En este mismo sentido están trabajando organismos como la Comisión E del ministerio de sanidad alemán, la OMS y ESCOP.

### Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos y modificación química de cabezas de serie

A partir de mediados de la década de los 80 se han iniciado a nivel mundial, por parte de la industria farmacéutica, universidades e instituciones nacionales de investigación, un gran número de programas de tamizado, a partir de plantas y otros organismos naturales, con el fin de encontrar nuevos productos naturales bioactivos suficientemente prometedores para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Esta aproximación es muy interesante por dos razones. En primer lugar porque de las cerca de

- Cromatografía en capa fina (CCF)
- Electroforesis en capa fina (TLE)
- Isotacoforesis (ITP)
- Electroforesis capilar (CE)
- Electro cromatografía capilar (CEC)
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Cromatografía de gases (GC)
- HPLC combinada con MS (ionización química o por electrospray)
- Cromatografía líquida (LC) combinada con UV/MS/RMN/FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*)

TABLA 1. Métodos de análisis y aislamiento para el programa de tamizado de plantas y trabajos de aislamiento, y para el análisis de constituyentes vegetales y sus metabolitos en sangre, suero y orina.

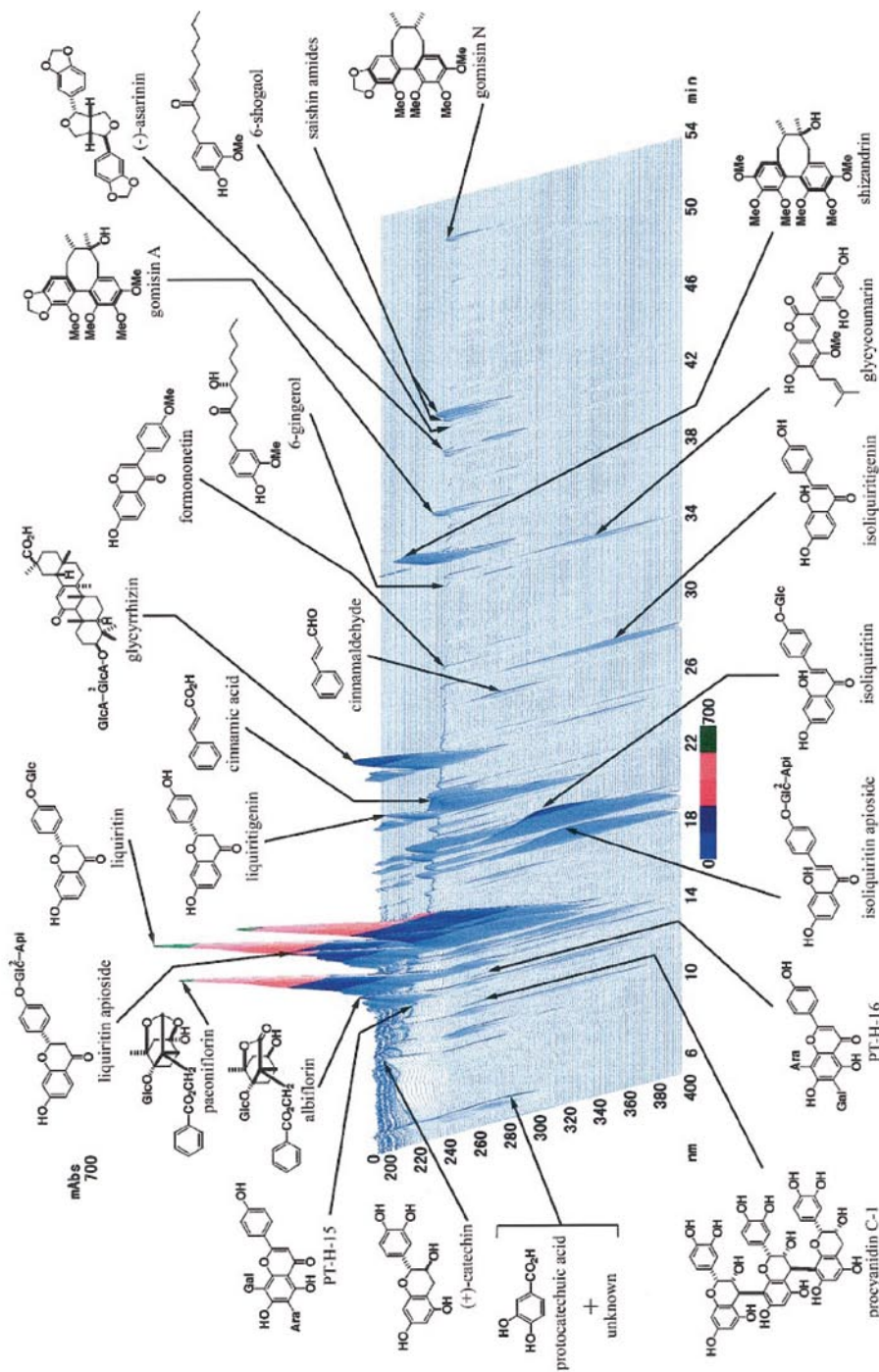


FIGURA 2. Perfil analítico tridimensional por 3D HPLC de Sho-seiyu-to (T J-19), extracto obtenido de ocho drogas vegetales de *Pinellia ternata*, *Glycyrrhiza glabra*, *Cinnamomum cassia*, *Schisandra chinensis*, *Asarum sieboldii*, *Paeonia lactiflora*, *Ephedra sinica* y *Zingiber officinale* (24).



300.000 especies vegetales de la Tierra, sólo alrededor de un 30% han sido investigadas química y farmacológicamente. Cada año surgen a la luz nuevos componentes interesantes, altamente activos detectados a partir de los programas de tamizado, algunos de los cuales más tarde se convierten en moléculas de gran trascendencia. En segundo lugar porque, a pesar del innegable éxito de la terapia con fármacos de síntesis y la antibioterapia, solo un 30% de las aproximadamente 2.000 enfermedades descritas tienen cura en la actualidad; las demás sólo son susceptibles de tratamiento sintomático y otras no tienen tratamiento. La necesidad de medicamentos eficaces, que actúen sobre la causa, para el tratamiento de enfermedades severas es, por tanto, un reto urgente. Todos los posibles recursos, incluidas las plantas medicinales y otros productos naturales que puedan proporcionar nuevos medicamentos, deben incluirse en los programas de investigación.

Por lo que se refiere a los procedimientos de tamizado farmacológico, esta tarea no se puede llevar a cabo de forma económicamente eficiente usando los métodos clásicos empleados hasta ahora en los laboratorios universitarios. A lo largo del tiempo, la industria farmacéutica ha desarrollado métodos de tamizado (*high throughput screening*) que han sido automatizados y perfeccionados hasta el punto de que pueden ser tamizados mensualmente hasta 10.000 muestras de compuestos (aislados o sintéticos) o de extractos. Estos métodos de alta tecnología son prometedores sólo cuando puede emplearse una batería de pruebas. Los ensayos de unión a receptores han cobrado una gran importancia debido a su selectividad y sensibilidad <sup>(26)</sup>.

La TABLA 2 muestra aquellas patologías para las cuales se necesitan urgentemente nuevos medicamentos más eficaces y con pocos o ningún efecto secundario. En el campo de la terapia antiinfecciosa, la prioridad es encontrar medicamentos para combatir eficazmente las infecciones por microorganismos que han creado multirresistencias frente a los antibióticos naturales o sintéticos actualmente disponibles.

En este contexto cabe señalar que en muchos casos los compuestos bioactivos aislados de plantas no alcanzan el máximo grado de efectividad deseable. Ello ha incitado a muchos laboratorios a transformar los principios activos de las plantas en derivados estructurales con mejor efectividad,

biodisponibilidad, farmacocinética o estabilidad. También se han dedicado esfuerzos a reducir la potencial toxicidad de un compuesto o convertirlo en un medicamento más fácilmente aplicable. Dos ejemplos pueden demostrar el interés de este enfoque: el ácido betulínico y la artemisinina.

El ácido betulínico es un compuesto presente en diferentes especies de *Betula*, así como en otras plantas, que ha mostrado ejercer una actividad antitumoral por medio de mecanismos de inducción de la apoptosis.

Un grupo de investigación francés, encabezado por la Prof. Lacaille-Dubois, ha sintetizado 38 derivados del ácido betulínico con diversos sustituyentes en las posiciones C<sub>3</sub> y C<sub>28</sub>. El efecto inductor de apoptosis sobre células de melanoma puede aumentarse desde un valor IC<sub>50</sub> de 1,1 µg/mL hasta 0,7 µg/mL <sup>(27)</sup>. Sorprendentemente, en una segunda aproximación, los investigadores encontraron que el ácido betulínico era también efectivo contra la infección por HIV. La sustitución del C<sub>3</sub>-OH y del grupo COO- en C<sub>28</sub> por un grupo dimetilsuccinil- y ω-aminoalcanoil respectivamente, aumentaba diez veces la actividad anti-HIV (FIGURA 3).

## Cáncer

Terapéutica y prevención

## Trastornos cardiovasculares

Antihipertensores

Antiateroscleróticos

Anti-isquémicos (prevención de accidentes vasculares)

## Sistema nervioso central

Tratamiento y prevención de:

Enfermedad de Alzheimer

Enfermedad Parkinson

## Enfermedades infecciosas

Antivirales (v.g., anti-HIV, anti-hepatitis B y C)

Antiparasitarios

Antifúngicos

## Afecciones inflamatorias

Antiasmáticos

Fármacos para colitis

Fármacos para neurodermatitis y psoriasis

TABLA 2. Nuevos fármacos requeridos prioritariamente en el mundo.

Otro ejemplo es la artemisinina, un peróxido de lactona sesquiterpénica de *Artemisia annua*, la cual ha sido usada en China desde tiempos antiguos para el tratamiento de la malaria. La conversión de la artemisinina en su 6-metil derivado (artemeter) aumentó la biodisponibilidad tras su aplicación preventiva, así como su eficacia frente a *Plasmodium falciparum*, parásito que se ha vuelto resistente a la mayor parte de fármacos de síntesis. <sup>(28)</sup>

**Tamizado biológico-molecular: perfil farmacológico global y efectos sinérgicos**

El desarrollo e introducción de ensayos de biología-molecular altamente selectivos y sensibles en el tamizado de extractos vegetales, fitopreparados y compuestos aislados ha revolucionado la investi-

gación sobre plantas medicinales. Estos métodos operan a nivel molecular (por ejemplo a nivel de dominios de receptores y genes, transducción de señales) y permiten conocer más a fondo los mecanismos de acción de los fármacos. Pueden encerrar la clave para el desarrollo de nuevos medicamentos etiotropos y de una Fitoterapia más racional. Las primeras investigaciones con estos métodos han revelado que el potencial farmacológico de muchos extractos y fitopreparados es mucho mayor de lo que se suponía. Además, los ensayos farmacológicos en los que se comparaba los compuestos aislados con los extractos o fracciones extractivas originales, han confirmado el conocimiento general de que muchos constituyentes vegetales, como por

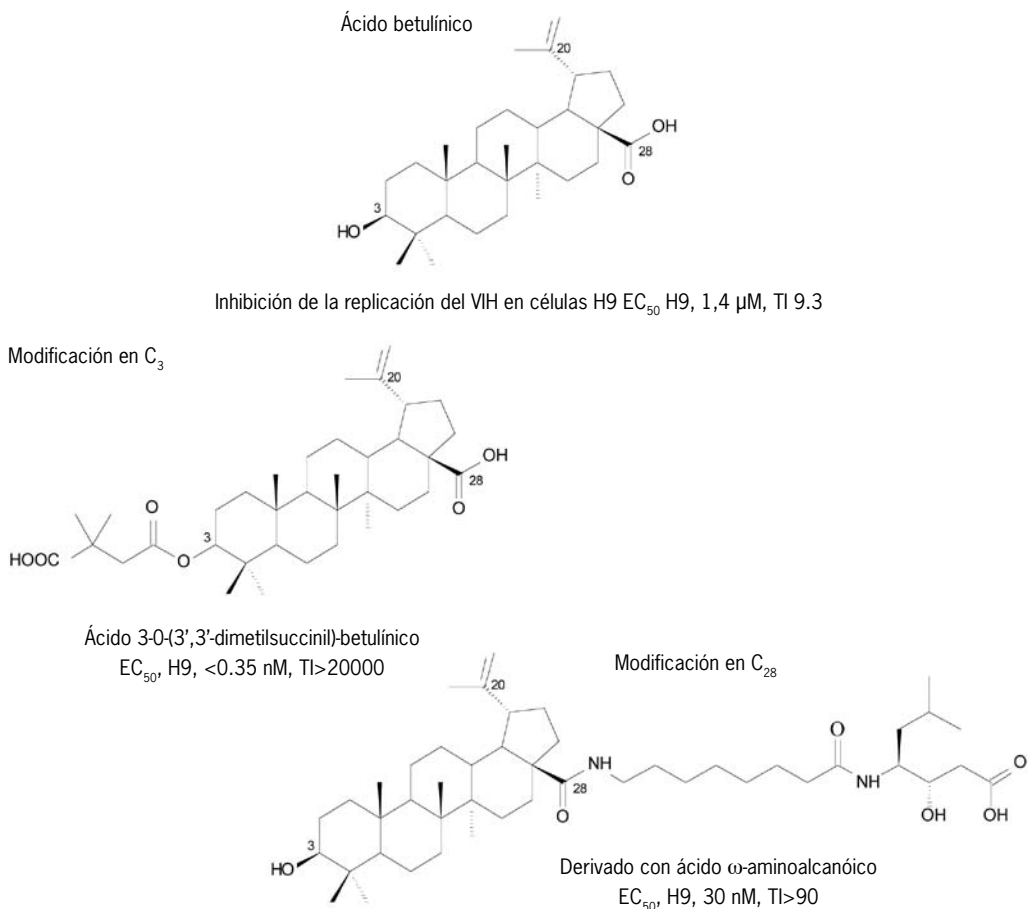


FIGURA 3. Actividad anti-HIV del ácido betulinico y sus derivados semisintéticos.

ejemplo los compuestos fenólicos y terpenoides, ejercen efectos farmacológicos polivalentes. Ello podría explicar los efectos de sinergia farmacológica y que frecuentemente los extractos producen un efecto terapéutico mayor que sus principios activos aislados.

Seguidamente se exponen diversos ejemplos sobre lo que se acaba de exponer.

#### Espino albar (*Crataegus oxyacantha*)

Al intentar racionalizar la actividad cardiotónica de los preparados a base de extractos de espino albar (*Crataegus oxyacantha*), verificada en numerosos estudios clínicos<sup>(29-30)</sup>, se vio que las proantocianidinas y los C-heterósidos flavónicos eran los principales responsables de dicha actividad. Además de las investigaciones realizadas con extractos, comprobamos que las fracciones de los extractos que contienen proantocianidinas y flavonoides presentan, *in vitro*, una actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), lo que sumado a un efecto relajante de la musculatura lisa (endotelina-dependiente) observado recientemente en un modelo de aorta, podría contribuir a la vasodilatación y consiguiente reducción de la tensión arterial<sup>(31, 32)</sup>.

Adicionalmente, los flavonoides actúan también como antioxidantes, inhibiendo la ciclooxigenasa y la 5-lipooxigenasa, lo que cabe esperar un efecto antiinflamatorio y antiagregante plaquetario. Estas investigaciones han valorado los C-heterósidos flavónicos como los principios activos responsables del efecto cardiotónico del espino albar. Ello sugiere que, para aumentar la eficacia de los medicamentos a base de espino albar, es conveniente que los extractos se preparen de forma que sean enriquecidos en ambos grupos de componentes activos y es un argumento para que los extractos se estandaricen en relación a ambos. Como conclusión, se puede afirmar que la polivalencia de los constituyentes del espino albar contribuye a explicar mejor su aplicación terapéutica en los casos de insuficiencia cardiaca leve y moderada (NYHA I y II).

#### Ajo (*Allium sativum*)

Desde hace unos años el papel farmacológico del ajo (*Allium sativum*) en la prevención y el tratamiento del cáncer y la aterosclerosis ha despertado un interés creciente. A falta de investigaciones sistemáticas sobre los mecanismos de acción moleculares de los componentes del ajo, se ha investigado la

actividad de la alicina y el ajoeno en dos nuevos modelos *in vitro*. El primero fue un modelo de inducción de apoptosis; en el segundo se empleó óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) de macrófagos humanos.

- El primer ensayo mostró que el ajoeno induce apoptosis en células leucémicas humanas, pero no en células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos. El ajoeno aumentó la producción intracelular de peróxido (especie reactiva del oxígeno, ROS) de forma dosis y tiempo dependiente, aumento que podía bloquearse parcialmente si se preincubaban las células leucémicas humanas con el antioxidante N-acetil-cisteína. Estos resultados sugieren que el ajoeno puede inducir la apoptosis a través de la estimulación de la producción peróxido y activación del factor nuclear  $\kappa$ B (ver FIGURA 4)<sup>(33)</sup>. Este descubrimiento constituye un paso importante en la explicación de los mecanismos moleculares de la acción antitumoral del ajo.
- El segundo ensayo mostró que la alicina y el ajoeno inhiben la expresión de la iNOS en macrófagos activados (ver FIGURA 5)<sup>(34)</sup>. Dado que la reacción inflamatoria en las lesiones ateroscleróticas da lugar a una expresión de la iNOS y, consecuentemente, a la formación de peroxinitrito y a un agravamiento del proceso, estos resultados proporcionan una interesante contribución a la explicación de los efectos beneficiosos del ajo en la prevención de la aterosclerosis.

Entre tanto, también en el caso del muérdago (*Viscum album*), se ha demostrado que la lectina I es capaz de inducir la apoptosis de células cancerosas. Ello sugiere que, aparte de la conocida actividad inmunoestimulante, el muérdago tiene un segundo mecanismo de acción a nivel molecular para su actividad antitumoral.

A partir de estos resultados, la conocida actividad polivalente del ajo (antiagregante plaquetaria, antiinflamatoria, hipotriglicéremiante, hipocolesterémiante, antioxidante y antimicrobiana) se ha visto ampliada con dos nuevos efectos farmacológicos. Puede considerarse un gran avance que, con estos modelos de biología molecular, se puede dar, por primera vez, una explicación científica plausible de la utilización preventiva de los preparados de ajo y sus posibles efectos beneficiosos. Se han descrito efectos similares sobre la apoptosis para numerosos constituyentes vegetales con conocida actividad antitumoral.



### Raíz de ortiga (*Urtica dioica*)

Los extractos hidroalcohólicos de la raíz de ortiga (*Urtica dioica*) se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. Su eficacia clínica ha sido demostrada en múltiples estudios observacionales y ensayos a doble ciego <sup>(35)</sup>. La raíz contiene una mezcla de isolecinas denominada UDA (*Urtica dioica* agglutin), con un peso molecular de 9.500 Da, que posee especificidad sobre la N-acetil-glucosamina <sup>(36)</sup>. Usando una preparación de receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGF) marcados con I<sup>125</sup>, se ha podido demostrar que la UDA es capaz de unirse a los receptores de EGF de la línea celular de cáncer epidérmico CA 431, en forma dosis-dependiente <sup>(37, 38)</sup>, lo que puede traducirse en una inhibición competitiva de la proliferación inducida por EGF (FIGURA 6). Además, los polisacáridos que aislamos de la raíz, mostraron actividades inmunomoduladora y antiinflamatoria <sup>(39)</sup>. Dado que las lectinas son muy estables frente al calor y los ácidos y que la UDA marcada con I<sup>125</sup> se detecta en suero tras su administración oral, es probable que la UDA sea absorbida a nivel intestinal en forma inalterada. En consecuencia, consideramos que la demostrada eficacia de las preparaciones de raíz de ortiga es debida a la sinergia entre los efectos antiproliferativo y antiinflamatorio producidos por estos dos grupos de componentes hidrosolubles.

### Cáñamo indiano (*Cannabis sativa*)

La tintura y el extracto de la sumidad de cáñamo indiano (*Cannabis sativa*), usados antiguamente por sus propiedades analgésica, sedante y anticolúsvante, fueron retirados del mercado farmacéutico a partir del aislamiento en la planta del tetrahidrocannabinol (THC), compuesto con efecto alucinógeno. Recientemente, el cáñamo indiano ha despertado nuevamente el interés debido a la detección de un sistema cannabonoide endógeno en determinadas áreas cerebrales y en el sistema inmune, representado por dos receptores para los cannabinoides: CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Investigaciones biológico-moleculares han identificado la araquidonil-etanolamina (anandamida) y el 2-araquidonil-glicerol como ligandos endógenos de dichos receptores. De acuerdo con los conocimientos actuales, este sistema de cannabonoide endógeno juega un importante papel en el desarrollo de la memoria, en la transmisión e inhibición de la sensación de dolor, en el control del apetito, en la lactancia, en la generación de la

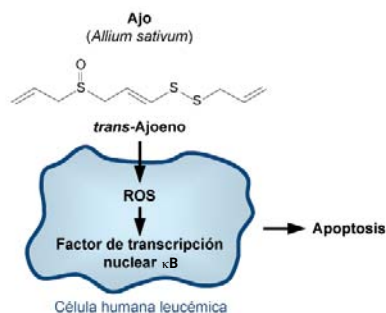


FIGURA 4. Mecanismo de acción del ajoeno del bulbo de ajo en la inducción de apoptosis en células leucémicas humanas <sup>(33)</sup>.

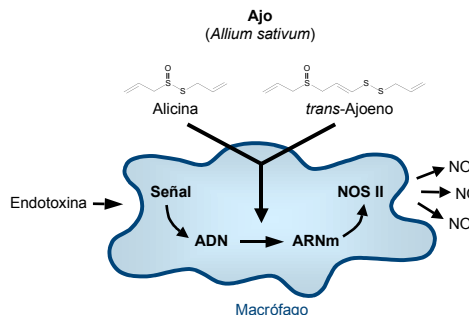


FIGURA 5. La alicina y el ajoeno del ajo inhiben la expresión de la NO sintasa inducible (iNOS) en macrófagos activados con endotoxina <sup>(34)</sup>.

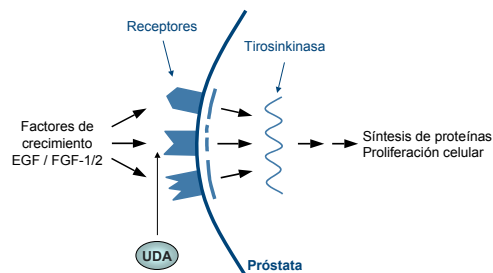


FIGURA 6. Posible mecanismo de inhibición del crecimiento del tejido prostático por la UDA de la raíz de ortiga (*Urtica dioica*) <sup>(35)</sup>.



emesis y como inmunomodulador. Entre los efectos farmacológicos más destacables del (-) *trans*- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, introducido recientemente en el mercado con el nombre comercial de Dronabinol<sup>®</sup>, los más interesantes son el relajante muscular, el estimulante del apetito y el analgésico <sup>(40)</sup>.

La idea de usar el THC aislado para el tratamiento de la esclerosis múltiple se abandonó al comprobar, en un estudio comparativo, que el extracto de cáñamo indiano inhibía la espasticidad mucho mejor que el THC aislado, evaluado en un modelo inmunogénico para esclerosis múltiple <sup>(41, 42)</sup>. La razón de esta superioridad probablemente sea debida al contenido en cannabidiol (CBD) en el extracto, que amplifica el efecto antiespasmódico y a la vez reduce los indeseables efectos psicotrópicos colaterales del THC. El cáñamo indiano es uno de los mejores ejemplos de efectos sinérgicos entre los diferentes constituyentes de un extracto, debidos a interacciones a nivel molecular.

#### Combinaciones de extractos

Los preparados a base de mezclas de extractos requieren un mayor esfuerzo en los trabajos de tamizado farmacológico y aislamiento para la evaluación de su perfil farmacológico. Recientemente se han presentado los resultados de un estudio multidisciplinar de la Universidad de Hong Kong. Estudiaron química y farmacológicamente un preparado que goza de gran reputación en la medicina tradicional china (TCM) para la prevención y el tratamiento del accidente cerebrovascular <sup>(43)</sup>. Consiste en la combinación de ocho drogas vegetales: raíz de *Salvia miltiorrhiza*, rizoma de *Ligusticum chuanxiong*, raíz de *Paeonia rubra*, raíz de *Angelica pubescens*, raíz de *Stephania tetrandra*, ramas con espinas de *Uncaria rhynchophylla*, rizoma de *Gastrodia elata* y raíz de *Panax ginseng*. Como resultado de un detallado análisis químico y una profunda investigación farmacológica, fue posible determinar los efectos farmacológicos de cada una de las drogas así como de sus principios activos en relación con la prevención y tratamiento del accidente cerebrovascular.

Las drogas de la TCM fueron clasificadas en cuatro categorías: activas sobre los canales colaterales en la zona de la obstrucción, antiinflamatorias, antitrombóticas y neuroprotectoras. Los efectos terapéuticos se describen como mejora de la circulación, aumento del flujo cerebral y protección cerebral frente a las lesiones producidas por isquemia y reperfusión. Por primera vez los investigadores

intentaron también interpretar la doctrina tradicional del yin y del yan de la TCM para el accidente cerebrovascular en términos de los criterios de diagnóstico de la medicina occidental. La eficacia clínica de este preparado compuesto de la TCM se explica por un sinergismo farmacocinético o farmacodinámico. De este último ejemplo se puede concluir que en muchos casos la eficacia de las combinaciones de drogas o extractos puede ser superior a la de los componentes aislados en eventos patofisiológicos complejos.

La idea de que los extractos totales o parcialmente purificados presentan ventajas sobre los principios activos aislados no es nueva, pero hasta hace poco no ha sido investigada sistemáticamente y racionalizada. Las evidencias de la sinergia en los medicamentos a base de plantas son crecientes, como muestra la revisión efectuada recientemente por Williamson <sup>(44)</sup>. Los estudios farmacológicos clásicos con combinaciones de principios activos han demostrado que es necesario diferenciar entre efectos aditivos y los sinérgicos sobreaditivos o de potenciación. Si dos sustancias bioactivas de una determinada mezcla tienen la misma diana farmacológica, es de esperar un efecto aditivo. Sin embargo, si dos o más sustancias de una combinación tienen diferentes dianas farmacológicas, puede producirse un efecto farmacológico sinérgico que puede ser mayor de lo que cabría esperar de su administración conjunta a partir de la suma de las potencias farmacológicas de cada sustancia (a condición de que ninguna de las sustancias de la mezcla ejerza un efecto antagónico). Para diversos extractos o fracciones de extractos, se han descrito efectos sinérgicos que superaban en un factor de 50 o más el efecto de compuestos aislados o mezclas de ellos a concentraciones equivalentes. Estos ensayos de dosis-respuesta con mezclas de principios activos aislados pueden ser llevados a cabo con los métodos isobol, tal como propone Berenbaum <sup>(45)</sup>. Nosotros hemos llevado a cabo un ensayo de agregación plaquetaria con mezclas de ginkgolidos A y B, dos de los principales constituyentes de *Ginkgo biloba* <sup>(46, 47)</sup>. La FIGURA 7 muestra la concavidad en la curva isobol típica de un efecto sinérgico de potenciación.

Entre otros muchos ejemplos similares, las siguientes combinaciones de principios activos han mostrado resultados análogos.

En un ensayo antimalaria, *in vitro*, la actividad de la artemisina de *Artemisia annua* aumentó en presencia de los flavonoides artemetina y casticina. En otro ensayo, la combinación de flavonoides por pares, entre genisteína, baicaleína, hesperetina, naringenina y quercetina mostró efectos sinérgicos en relación a la inhibición de una línea celular humana de cáncer de mama.

Es evidente que este método isobol no es aplicable a los extractos vegetales o sus combinaciones. En

estos casos, deben realizarse ensayos farmacológicos detallados con componentes individuales o mezclas de ellos y comparar el efecto con el extracto total o con alguna fracción del mismo. En la TABLA 3 se muestra una lista de drogas vegetales para las cuales se han comprobado efectos sinérgicos de potenciación, así como los principales constituyentes químicos empleados en la comparación. También se han demostrado efectos farmacológicos sinérgicos con la mezcla de raíz de ortiga (*Urtica dioica*) y corteza de pigoem (*Pygeum africanum*), que tiene buena reputación en el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata <sup>(48)</sup>. En este caso, la combinación produjo una inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa y la aromatasa significativamente mayor que ambas drogas vegetales por separado.

En contraste con estos ejemplos, también se pueden observar efectos farmacológicos antagonistas con algunas combinaciones. En el siguiente apartado se presentan ejemplos adicionales de efectos agonistas y antagonistas dentro de un mismo extracto vegetal.

### Ensayos clínicos y estudios de farmacocinética y biodisponibilidad

Los fitoquímicos, biólogos y biólogos moleculares no pueden realizar estudios clínicos, pero sí proveer a los clínicos de extractos estandarizados. Además, como expertos en el análisis de los constituyentes de las drogas vegetales, pueden realizar determinaciones cuantitativas y cualitativas de principios activos y sus metabolitos en el plasma, orina u otros fluidos orgánicos para determinar la biodisponibilidad y el perfil farmacocinético de los principios activos de los extractos administrados. Debido a que la eficacia de un medicamento fitoterápico en el hombre solo puede demostrarse a través de estudios clínicos, desde 1995 se han realizado grandes esfuerzos, especialmente en Europa y particularmente en Alemania, para satisfacer los requerimientos de la administración sanitaria. El ensayo clínico a doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo se considera el mejor nivel de evidencia para demostrar la eficacia de los medicamentos (de origen vegetal o sintéticos). Dependiendo de la cuestión a investigar, estos ensayos pueden realizarse frente a placebo solamente o también frente a una medicación de referencia, cuando exista para la indicación concernida.

Los requisitos específicos, en Europa, para el registro de comercialización de un producto fitoterápico

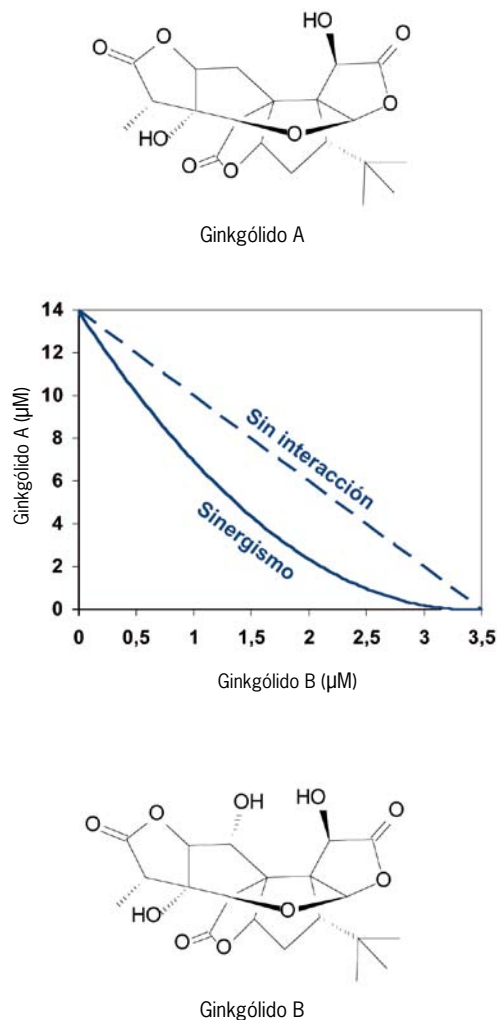


FIGURA 7. Efecto sinérgico de una mezcla de ginkgolido A + B en un ensayo de agregación plaquetaria <sup>(45-47)</sup>.



Extracto/aceite esencial	Principales constituyentes
<i>Ginkgo biloba</i> <sup>(49)</sup>	Gingkólidos A y B
<i>Piper methysticum</i> <sup>(50)</sup>	Kavaína, dihidrokavaína, metisticina, dihidrometisticina, yangonina y desmetoxyyangonina
<i>Glycyrrhiza glabra</i> <sup>(51-53)</sup>	Glicirricina/isoliquiritina
<i>Cannabis sativa</i> <sup>(54)</sup>	Tetrahidrocannabinol/cannabidiol
<i>Valeriana officinalis</i> <sup>(55)</sup>	Valtrato, isovaltrato/valeranona, ácido valérenico
<i>Zingiber officinale</i> <sup>(56)</sup> (aceite esencial)	$\alpha$ -zingibereno, $\beta$ -sesquifelandreno, bisaboleno, curcumeno

TABLA 3. Drogas vegetales para las cuales se han demostrado efectos sinérgicos de potenciación para entre sus componentes.

están recogidos en diversas Directivas (75/318 EEC de 1975, 91/507/EEC de 1991, 2004/24/CE de 2004 y otras). Además, en la actualidad existen guías sobre control de calidad y normas de fabricación de productos a base de plantas medicinales elaboradas la Agencia Europea del Medicamento (EMA).

En cuanto a los requisitos sobre eficacia de los preparados a base de plantas, existe una gran divergencia entre los distintos estados europeos, pero se están realizando grandes esfuerzos para conseguir su armonización en un futuro próximo <sup>(57, 58)</sup>. Todo parece indicar que existirán tres categorías de productos:

- Medicamentos a base de plantas.
- Medicamentos tradicionales a base de plantas.
- Complementos alimentarios o dietéticos.

Los ensayos clínicos solo serán necesarios para el registro de la primera categoría de medicamentos, pero los requisitos de seguridad serán obligatorios para las tres categorías, incluida la de complemento alimentario <sup>(59)</sup>.

En la actualidad existen más de 400 estudios clínicos controlados con placebo a ciego simple o a doble ciego que han sido desarrollados de acuerdo con los requisitos internacionales. Un 80% de estos estudios se han realizado con las drogas listadas en la TABLA 4. Los avances conseguidos pueden resumirse como sigue:

- Los estudios clínicos realizados han hecho posible integrar los preparados fitoterápicos en el concepto de terapia racional.
- Las "indicaciones poéticas" de antaño de muchos preparados fitoterápicos han podido eliminarse, las indicaciones para muchos otros han podido ser confirmadas y mejor delimitadas y para algu-

nos se han podido describir nuevas indicaciones.

- Sorprendentemente, cerca de un 20% de los fitopreparados investigados han mostrado una equivalencia terapéutica con los fármacos de síntesis con los que se compararon para una misma indicación (TABLA 5).
- Para muchos extractos estandarizados se ha podido demostrar una eficacia terapéutica superior a la de los principios activos aislados.

Esto último confirma de forma concluyente algunas investigaciones farmacológicas comparativas con extractos y compuestos aislados que mostraron efectos sinérgicos de potenciación.

La mejor evidencia de esta sinergia se puede ejemplificar mediante la comparación de la cantidad de compuestos bioactivos de un extracto de hipérico con la del fármaco sintético imipramina en un ensayo clínico <sup>(60)</sup>.

La reducción porcentual en la puntuación de la escala de Hamilton para la depresión (HAM-D) tras seis semanas de tratamiento de los pacientes con depresión moderadamente severa, fue similar en el grupo al que se administró extracto de hipérico (500 mg/día, equivalentes a 8-10 mg del conjunto de principios activos: hipericina, hiperforina, xantonas, flavonoides, proantocianidinas) y en el grupo tratado con imipramina (150 mg/día), como se muestra en la FIGURA 8). Se puede concluir que 8-10 mg del conjunto de los principios activos del extracto de hipérico son terapéuticamente equivalentes a 150 mg de imipramina. Esta equivalencia terapéutica no es explicable por un aumento en la tasa de absorción y, por consiguiente, de la biodisponibilidad de los constituyentes del hipérico, atribuible a algunos constituyentes no bioactivos del extracto.



Por otra parte, existen evidencias clínicas de la superioridad terapéutica de un extracto de corteza de sauce frente a un principio activo aislado, y de la combinación de valeriana/kava-kava y ginseng/ginkgo sobre cada una de las drogas por separado, para las mismas indicaciones <sup>(61-63)</sup>.

En los últimos años, paralelamente a los estudios clínicos, se han llevado a cabo ensayos de biodisponibilidad y farmacocinética de los principios activos para diversos medicamentos fitoterápicos. Estos estudios han sido posibles gracias a la mejora de los métodos analíticos como las técnicas HPLC acopladas a MS y DAD, radioinmunoensayo o la tomografía computerizada para evaluar el efecto de las drogas administradas sobre la circulación sanguínea y la actividad neuronal en el cerebro humano <sup>(64)</sup>.

Los estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad son necesarios ya que permiten correlacionar los efectos farmacológicos con los resultados clínicos,

optimizar las dosis y posologías, así como mejorar las formas de administración del preparado fitoterápico para aumentar la tasa de absorción, conocer mejor las vías de metabolización y eliminación, así como las posibles interacciones con otros constituyentes vegetales u otros medicamentos. Probablemente en un futuro próximo, este tipo de estudios serán un requisito para la realización de estudios clínicos, lo que contribuirá de forma importante a la racionalización de la Fitoterapia y a contrarrestar la opinión esgrimida con cierta frecuencia de que los preparados fitoterápicos son placebos puesto que no se conocen sus constituyentes activos.

**Objetivos y posibilidades de la Fitoterapia en un futuro próximo**

Los tres ámbitos principales de investigación de la Fitoterapia, ya mencionados, constituirán sus objetivos prioritarios en un próximo futuro, independientemente de si se trata de preparados clasificados

> 400 estudios controlados simple y doble ciego de los cuales: ~ 80% eran preparados monoextracto ~ 20% eran combinaciones (presentaciones compuestas)		
<b>Principales plantas implicadas</b>		
Ginkgo	Hipérico	Espino albar
Equinácea	Ajo	Valeriana
Kava-kava	Sabal	Ortiga
Sauzgatillo	Harpagofito	Sauce
Castaño de Indias	Cardo mariano	

TABLA 4. Demostración de eficacia de los preparados fitoterápicos en estudios clínicos a doble ciego y controlados frente a placebo (hasta 2001).

Extracto	Fármaco de síntesis	Indicación
<i>Crataegus</i> sp. (espino albar)	Captopril	Insuficiencia cardíaca HI NYHA
<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	Imipramina Amitriptilina	Depresión leve y moderada
<i>Sabal serrulata</i> (sabal)	Proscar (finasteride)	Hiperplasia prostática benigna HI
<i>Hedera helix</i> (hiedra)	Ambroxol	Bronquitis crónica
<i>Boswellia serrata</i> (incenso de la India)	Sulfasalazina	Enfremedad de Crohn

TABLA 5. Ejemplos de equivalencia terapéutica entre extractos estandarizados de drogas vegetales y fármacos de síntesis, evidenciados por estudios clínicos comparativos controlados con placebo.

como medicamentos convencionales o medicamentos tradicionales:

- Asegurar la calidad de los fitopreparados por medio de la estandarización.
- La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de origen vegetal.
- La investigación farmacológica y biológico-molecular y el desarrollo de estudios clínicos, farmacocinéticos y de biodisponibilidad.

La búsqueda de nuevos compuestos farmacológicamente activos para el desarrollo de nuevos medicamentos es un aspecto importante, pero no el único, ya que la tendencia creciente a utilizar extractos vegetales estandarizados, de alta calidad, con garantía de seguridad y eficacia va a continuar. Por tanto, se deben dirigir todos los esfuerzos a investigar el perfil químico-farmacológico de los extractos y combinaciones y racionalizar su aplicación terapéutica. Solamente de esta forma, y dependiendo del nivel de evidencia de eficacia terapéutica demostrado, es posible que en el futuro se disponga de medicamentos fitoterápicos altamente activos, etiológicos, seguros y eficaces, capaces de reemplazar algunos medicamentos de síntesis o, en otros casos ser suficientemente potentes para ser aplicados en combinación con fármacos de síntesis.

En este contexto también será necesario encontrar explicación científica y racional al hecho de que muchos preparados fitoterápicos, normalmente administrados a dosis pequeñas en relación con su contenido en principios activos, produce un efecto farmacológico o terapéutico no inmediato, sino que éste se manifiesta de forma óptima tras un periodo de tratamiento relativamente largo (por ejemplo 3 a 4 semanas).

El mayor reto de la investigación en Fitoterapia será el cambio de paradigmas que está ocurriendo en la farmacoterapia. Este cambio puede ser descrito como un abandono de la monoterapia y una transición hacia el tratamiento de los pacientes con combinaciones de dos, tres o más fármacos. Esta multifarmacoterapia se ha introducido por ejemplo en el tratamiento del SIDA y la hipertensión, entre otras enfermedades. El segundo cambio de paradigma puede definirse como una modificación de la estrategia de medicación, caracterizada como una terapia multidiana. Tomando como ejemplo la terapia antitumoral, esta nueva estrategia está dirigida a destruir las células tumorales no por la vía

directa de interacción del fármaco con el ciclo de la célula tumoral, sino por otros mecanismos que no dañen a las células sanas. Esta medicación puede estar orientada, por ejemplo, a inducir la apoptosis en las células tumorales, a inhibir la angiogénesis, a estimular los mecanismos inmunológicos de defensa, tanto específicos como inespecíficos, a inducir la expresión de los antioncogenes y a activar la producción de proteínas del estrés (*heat shock proteins*) (FIGURA 9). Esta nueva y ambiciosa estrategia terapéutica, todavía en fase de desarrollo, es un reto para la investigación en Fitoterapia, porque el intento de tratamiento según esta estrategia es un concepto que ha estado tradicionalmente presente en la Fitoterapia.

### Conclusión

Cuatro áreas de investigación determinarán en gran medida el contenido y las estrategias de la investigación en Fitoterapia:

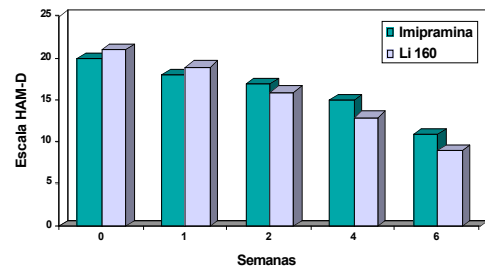


FIGURA 8. Ensayo clínico comparativo a doble-cego con extracto de hipérico e imipramina.

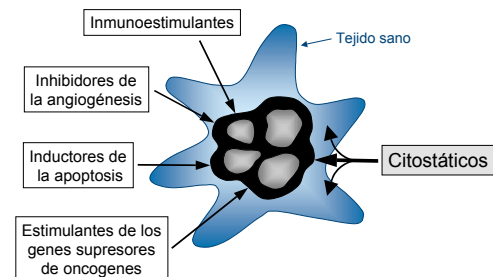


FIGURA 9. Nuevas estrategias para el desarrollo de nuevos medicamentos a base de plantas. Ejemplo: terapia del cáncer.



1. Los métodos de alta tecnología para el análisis químico y estandarización de los extractos vegetales.
2. La búsqueda de principios activos en las plantas y su utilización como cabezas de serie para el desarrollo de nuevos medicamentos indicados para enfermedades que no tienen un tratamiento eficaz en la actualidad.
3. La integración de los nuevos métodos de biología molecular para el tamizado farmacológico de plantas y sus constituyentes.
4. El desarrollo de estudios de eficacia conforme a las normas de buenas prácticas clínicas y de ensayos de biodisponibilidad de los extractos vegetales estandarizados.

Otro reto importante será la investigación de la multiplicidad de dianas y efectos farmacológicos de los constituyentes vegetales y los extractos, para poder comprender y racionalizar la superioridad terapéutica de muchos extractos sobre sus componentes aislados. Finalmente, hay que destacar que la demostración de la eficacia de los preparados fitoterápicos por medio de estudios clínicos a doble ciego controlados con placebo combinados con estudios de farmacocinética y biodisponibilidad encierra la clave de una Fitoterapia racional plenamente aceptada.

#### Dirección de contacto

Prof. em. Dr. Hildebert Wagner  
 Institut für Pharmazeutische Biologie  
 Zentrum für Pharmaforschung  
 Universität München  
 Butenandtstrasse 5-13,  
 D-81377 Munich (Alemania)  
 e-mail: H.Wagner@cup.uni-muenchen.de

#### Referencias bibliográficas

1. Nettleton DE. Phytomedicine in Europe: Their chemistry and biological activity. *Drugs of the Future* 1996; 21(12): 1257-1264.
2. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997; 60: 52-60.
3. Shu YZ. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 1998; 61: 1053-1071.
4. Tyler VE. Phytomedicines: Back to the future. *J Nat Prod* 1999; 62: 1589-1592.
5. Wagner H. Phytomedicine research in Germany. *Environmental Health Perspectives* 1999; 7: 779-781.
6. Ernst E. Herbal medicine: A concise overview for professionals. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.
7. Schulz V, Hansel R, Tyler V. Rational phytotherapy. Berlin: Springer-Verlag, 2001.
8. Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants, *Phytochemistry* 2001; 56: 237-243.
9. Ernst E, Pittler MH, Stevinson C, White A, Eisenberg D. (eds.). A desktop guide to complementary and alternative medicine: An evidence-based approach. London: Mosby Inc, 2001.
10. IFPMA (International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations). Major steps towards global drug regulations (4 ICH Conference in Brussels), *Health Horizons* 1997; 32.
11. WHO (World Health Organization). Legal status of traditional medicine and complementary alternative medicine: A worldwide review. Geneva: World Health Organization, 2001. WHO/EDM/TRM/2001.2.
12. Blumenthal M (Ed.). The complete German Commission E monographs. Herbal guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council, 1998.
13. Keller, K. Legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in the Federal Republic of Germany. *J Ethnopharmacol* 1991; 32: 225-229;
14. WHO (World Health Organization) Guidelines for the Assessment of herbal medicines (WHO/TRM/91.4) Ginebra: WHO, 1991.
15. WHO (World Health Organization). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. Ginebra: WHO, 1999.
16. WHO (World Health Organization). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 2. Ginebra: WHO, 2002.
17. ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy). 2003. ESCOP Monographs. The scientific foundation for herbal medicinal products. Exeter: ESCOP; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; New York: Thieme NewYork (2003).
18. Soltis DE, Soltis PS. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis in molecular systematics. En: Soltis DE, Soltis PS, Soltis JJ, Doyle JJ. (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1998, pp. 1-34.
19. Bachmann K. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research, *Opera Bot* 1997; 137-148.
20. Heubl G, Meinberg H. Personal communication.
21. Wolfender JL, Hostettmann K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in the investigation of medicinal plants. En: Anason JT, Mata R, Romeo (eds.). *Phytochemistry of medicinal plants*. New York: Plenum Press, 1995, pp. 189-215.
22. Stecher G, Huck CW, Stöggli WM, Bonn GK. Phytoanalysis: A challenge in phytomics. *TrAC Trends Anal Chem* 2003; 22(1): 1-14.
23. Bauer R, Tittel G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine* 1996; 2 (3): 193-198.
24. Amagaya S, Iizuka A, Makino B, Kubo M, Komatsu Y, Cheng FCh, et al. General pharmacological properties of Sho-seiryu-to (TJ-19) extracts. *Phytomedicine* 2001; 8: 338-347.
25. Bauer R, Tittel G. Quality assessment of herbal prepara-



- tions as precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine* 1996; 2: 193-198.
26. Bohlin L, Bruhn JG, Bioassay methods in natural product research and drug development. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 1999 Volume 43 (Dordrecht: Kluwer Academic Publ.).
27. Baglin I, Mitaine-Offer AC, Nour M, Tan K, Cave C, Lacaille-Dubois MA. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 2003; 3: 525-539.
28. Phillipson JD. New drugs from plants: It could be yew. *Phytotherapy Res* 1999; 13: 1-7.
29. Tauchert M, Block M, Hübner WD. Wirksamkeit des Weißdorn-Extraktes LI 132 im Vergleich mit Captopril-Multizentrische Doppelblindstudie bei 192 Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium II nach NYHA. *Münch Med Wschr* 1994; 136 (Suppl. 1): 27-33.
30. Tauchert M., Efficacy and safety of *Crataegus* extract WS 1442 in comparison to placebo in patients with chronic stebel heart insufficiency at NYHA III. *Am Heart Journal* 2002; 143 (5): 910-915.
31. Wagner H, Elbl G, Lotter H, Guinea M. Evaluations of natural products as inhibitions of angiotensin-I-converting enzyme (ACE). *Pharma Pharmacol Lett* 1991; 1: 15-18.
32. Franck U, Günther B, Vierling W, Wagner, H. Investigation of *Cecropia* and *Crataegus* extracts for their angiotensin converting enzyme inhibitory and vasorelaxant activities. *Phytomedicine* 1996; 1: 93.
33. Dirsch VM, Gerbes AT, Vollmar AM. Ajone, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyclo-leucemie species and activation of nuclear factor KB. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 402-407.
34. Dirsch VM, Kiemer AK, Wagner H, Vollmar AM. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 1998; 139: 333-339.
35. Schilcher H. Herbal drugs in the treatment of benign prostatic hyperplasia. En: Lawson LD, Bauer R. *Phytomedicines of Europe*. American Chemical Society, 1998, Symposium Series 691.
36. Peumans WJ, De-Ley M, Broehaert WF. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Lett*, 177: 99-103.
37. Wagner H, Willer F, Samtleben R, Boos G. Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine* 1994; 1: 213-214.
38. Wagner H, Geiger WN, Boos G, Samtleben R. Studies on the binding of *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and other lectins in an in vitro epidermal growth factor receptor test. *Phytomedicine* 1995, 4: 287-290.
39. Wagner H, Willer F, Samtleben R, Boos G. . Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine* 1994; 1: 213-224.
40. Bruhn C. Dronabinol der Wirkstoffim Hanf Dtsch Apoth Ztg 2002; 142: 3057-3063.
41. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 2000; 404: 84-87.
42. Williamson EM, Evans FJ. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs* 2000; 60 (6): 1305-1314.
43. Gong X, Sucher NJ. Stroke therapy in traditional Chinese medicine (TCM): Prospects of drug discovery and developments, *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 191-196.
44. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001; 8: 401-409.
45. Berenbaum M. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989; 41: 93-141.
46. Steinke B. Chemisch-analytische und Pharmakologische Untersuchungen von Pflanzlichen PAF-Antagonisten und Inhibitoren der Thrombozytenaggregation (*Allium*-Arten, *Ginkgo biloba*, *Pinellia ternata*). Tesis, Munic: Universtät München (1993).
47. Wagner H. New approaches in phytopharmacological research. *Pure Appl Chem* 1999; 71(9): 1649-1654.
48. Hartmann RW, Mark M, Soldati F. Inhibition of a 5 $\alpha$ -reductase and aromatase by PHL-00801 (Prostatonin), a combination of PY102 (*Pygeum africanum*) and UR 102 (*Urtica dioica*) extracts, *Phytomedicine* 1996; 3/2: 121-128.
49. Chung KF, Mc Cusker M. Page P, Dent KG, Guinot P, Barnes PJ. Effect of ginkgolide mixture (BN52063) in antagonizing skin and platelet responses to platelet activating factor in man. *The Lancet* 1987 31: 248-250.
50. Singh YN, Blumenthal M. Kava: an overview. *Herbalgram* 1997; 39: 33-56.
51. Cantelli-Forti G, Maffei F, Hrelia P, Bugamelli F, Bernadi M, D'intino P, et al. Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (Suppl. 9): 65-68.
52. Kimura M, Kimuar I, Guo X, Luo B, Kobayashi S. Combined effects of Japanese-Gino medicine Kakkon-to-ka-senkyu-shine and its related combinations and component drugs on adjuvant-induced inflammation in mice. *Phytother Res* 1992; 6(4): 209-216.
53. Miaorong P, Jing L. Correlativity analysis on detoxifying effect of *Radix Glycyrrhizae* on *Radix Aconiti Preparata* in Sini Decoction. Proc. 40th Anniversary Conference, Beijing University of Chinese Medicine 1996, August 28-30. Beijing University Press.
54. Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta-9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology* 1982; 76: 245-250.
55. Hölzl J. The pharmacology and therapeutics of Valeriana. En: Houghton PJ (ed.), Hardman R. (series ed.). *Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles*, Vol. 1, Valerian. The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 1997, pp. 55-57.
56. Beckstrom-Sternberg SM, Duke JA. Potential for synergistic action of phytochemicals in spices, En: Charalambous G. (ed.), Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier, 1994, pp. 210-233.
57. Anderson LA. Herbal medicinal products: Regulation in the UK and European Union. En: Ernst E. (ed.). *Herbal medicine: A*





concise overview for professionals. Oxford: Butterworth Heine-  
mann, 2000, pp. 100-113.

58. Loew D, Schroedter A. Quality and standardization of her-  
bal medicinal products. En: Ernst E. (ed.). Herbal medicine: A  
concise overview for professionals. Oxford: Butterworth Heine-  
mann, 2000, pp. 59-68.

59. De Smet, PAGM. Toxicological outlook on the quality assur-  
ance of herbal drugs. En: De Smet PAGM, Keller K, Hansel R,  
Chandler RF (eds.). Herbal Drugs Volume 1, Springer Verlag,  
1992, pp. 1-72.

60. Woelk H. Comparison of St. John's wort and imipramine for  
treating depression: Randomised controlled trial. British Medi-  
cal Journal 2000; 321: 536-539.

61. Schmidt B, Ludke R, Selbmann HK, Kotter I, Tschirdewahn

B, Schaffner W, et al. Efficacy and tolerability of a standardized  
willow bark extract in patients with osteoarthritis randomised,  
placebo-controlled, double blind clinical trial. Phytother Res  
2001; 15 (4): 344-350.

62. Wheatley D. Stress induced insomnia treated with kava and  
valerian. Human Psychopharmacol 2001; 16: 353-356.

63. Scholey AB, Kennedy DO. Acute, dose-dependent cognitive  
effects of Ginkgo biloba, Panax ginseng and their combination  
in healthy young volunteers: Differential interactions with cog-  
nitive demand. PsychoPharmacology 2002; 17: 35-44.

64. Bhattaram VA, Graefe U, Kohlert C, Kveit M, Derendorf H.  
Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal pro-  
ducts. Phytomedicine 2002; Suppl. 2, pp. 1-33.