

## Artigo

## Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios

Casanova, L. M.; Costa, S. S.\*

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (2), 575-595. Data de publicação na Web: 7 de março de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

### Synergistic Interactions in Natural Products: Therapeutic Potential and Challenges

**Abstract:** Medicinal plants are important source of therapeutic resources, as evidenced by several drugs prepared from substances of vegetal origin or inspired on pharmacophores of natural substances. However, herbal extracts frequently exhibit more pronounced biological activities than their isolated constituents. This often results from the synergistic interactions between these components that can act generally on multiple targets. The synergy between drugs has been explored in recent years for the treatment of various diseases, especially cancer and AIDS. The combination of active substances has been particularly promising in the treatment of complex diseases since it allows the simultaneous action on several targets, ensuring the efficacy and a reduced chance of resistance to the drugs used. In this context, medicinal plants and its metabolites have deserved increasing interest. Synergistic interactions, which may be observed among components of plant extracts as well as among natural products and synthetic drugs, have a significant therapeutic potential. However, suitable methods to understand these interactions are needed. Additionally, the technological application of plant products whose biological activity involves synergy requires techniques to analyze the overall composition of them. In this review, relevant examples of synergy will be discussed, with a focus on medicinal plants and bioactive secondary metabolites of plant origin. We also discuss methods applicable to synergy evaluation, as well as useful technical standardization and quality control of plant extracts whose pharmacological activity is due to multiple components.

**Keywords:** Synergy; medicinal plants; secondary metabolites; bioactive compounds.

### Resumo

Plantas medicinais constituem uma importante fonte de recursos terapêuticos, conforme atestam diversos medicamentos provenientes de substâncias de origem vegetal ou inspirados em seus farmacóforos. Entretanto, frequentemente, extratos de plantas medicinais exibem atividades biológicas mais pronunciadas que seus constituintes isolados. Isso se deve, muitas vezes, às interações sinérgicas entre tais componentes, envolvendo, em geral, a atuação sobre múltiplos alvos. A sinergia entre medicamentos tem sido explorada nos últimos anos para o tratamento de diversas doenças, sobretudo o câncer e a AIDS. A combinação de substâncias ativas mostra-se particularmente promissora no tratamento de doenças complexas, pois permite a atuação simultânea sobre diversos alvos, garantindo maior eficácia e menor chance de resistência aos fármacos empregados. Nesse contexto, as plantas medicinais e seus metabólitos têm sido objeto de crescente interesse. Interações sinérgicas, que podem ser observadas tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, apresentam significante potencial terapêutico. Entretanto, são necessários métodos de estudo adequados para compreendê-las. Adicionalmente, a aplicação tecnológica de produtos de origem vegetal, cuja atividade biológica envolve sinergia, requer técnicas que permitam analisar a composição global destes. Na presente revisão serão discutidos exemplos relevantes de sinergia com enfoque em plantas medicinais e metabólitos secundários bioativos de origem vegetal. Também serão discutidos métodos aplicáveis a estudos de sinergia, bem como técnicas utilizáveis na padronização e no controle de qualidade de extratos vegetais cuja atividade farmacológica se deve a múltiplos componentes.

**Palavras-chave:** Sinergia; plantas medicinais; metabólitos secundários; substâncias bioativas.

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, Bloco H, CCS, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

 [sscostabh@gmail.com](mailto:sscostabh@gmail.com); [sscbh@terra.com.br](mailto:sscbh@terra.com.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20170034](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170034)

## Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios

Livia M. Casanova, Sônia S. Costa\*

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, Bloco H, CCS, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

\* [sscostabh@gmail.com](mailto:sscostabh@gmail.com); [sscbh@terra.com.br](mailto:sscbh@terra.com.br)

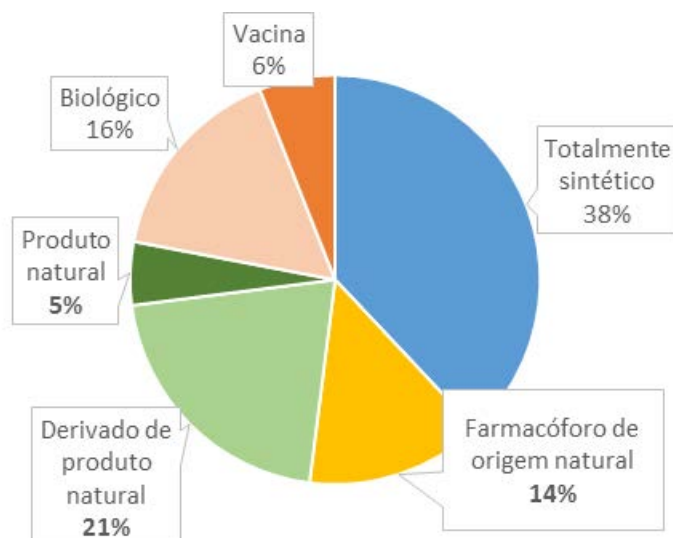
*Recebido em 17 de abril de 2016. Aceito para publicação em 22 de fevereiro de 2017*

1. Introdução
2. Origem evolutiva da sinergia entre metabólitos secundários vegetais
3. Interações sinérgicas em produtos naturais bioativos
  - 3.1. Sinergia entre componentes de uma espécie medicinal
  - 3.2. Sinergia em combinações de extratos vegetais
  - 3.3. Sinergia entre produtos naturais e fármacos de uso clínico
4. Estratégias para estudos de sinergia
5. Controle de qualidade de fitoterápicos que atuam por efeitos sinérgicos
6. Conclusão

### 1. Introdução

O uso de plantas para tratar e prevenir doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade.<sup>1</sup> Nos dias atuais, plantas medicinais continuam a desempenhar um papel importante como fontes de agentes terapêuticos, originando medicamentos fitoterápicos ou substâncias

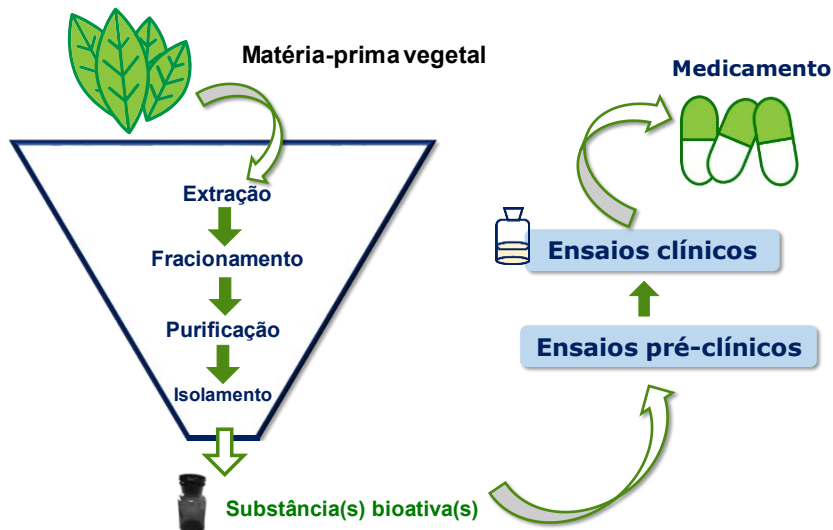
ativas isoladas que podem ser utilizadas diretamente como medicamentos ou como protótipos para a síntese de novos fármacos.<sup>1,2</sup> De acordo com Newman & Cragg<sup>3</sup>, dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2014 para uso clínico, 26% eram produtos naturais ou derivados e 13% apresentavam grupamento farmacofórico de origem natural, conforme mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Origem de novos medicamentos no período de 1981 a 2014 (adaptado de Newman & Cragg<sup>3</sup>)

Na investigação de plantas medicinais com potencial terapêutico, a abordagem geralmente utilizada envolve processos de extração, fracionamento e purificação, que resultam no isolamento e identificação de

uma ou mais substâncias bioativas.<sup>4-6</sup> Dessa forma, foram obtidos diversos fármacos a partir de plantas medicinais, conforme mostrado na Figura 2.



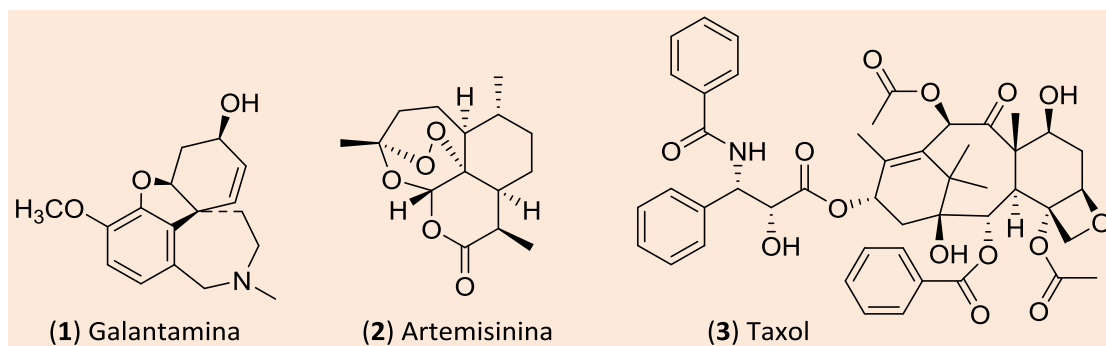
**Figura 2.** Esquema de estratégia clássica para a descoberta de novos medicamentos a partir de produtos naturais

Exemplos mais recentes de fármacos de origem vegetal incluem a galantamina (1), a artemisinina (2) e o taxol (3), utilizados no tratamento de doença de Alzheimer, malária e câncer, respectivamente (Figura 3).<sup>7-10</sup> Entretanto, frequentemente, os processos de

fracionamento e purificação de extratos vegetais levam à redução ou perda da atividade biológica inicialmente observada. É igualmente frequente a constatação de que misturas complexas de substâncias de origem natural produzem efeitos mais pronunciados

que doses proporcionais de seus constituintes isolados.<sup>5,6,11,12</sup> Interações aditivas ou sinérgicas são as explicações

usualmente propostas para explicar esses fatos.<sup>1,11</sup>



**Figura 3.** Exemplos de fármacos derivados de plantas medicinais

De acordo com Wagner & Ulrich-Merzenich,<sup>13</sup> interações aditivas ocorrem quando o efeito da mistura de duas ou mais substâncias é igual ao simples somatório do efeito destas, isoladamente. As interações sinérgicas, por sua vez, são observadas quando o efeito produzido por uma combinação de substâncias é superior ao que se poderia esperar com base na contribuição individual de seus componentes. De acordo com Eid *et al.*,<sup>14</sup> o termo sinergia provém da palavra grega “synergos”, que significa trabalhar em conjunto. Na área biomédica, frequentemente o termo sinergismo é utilizado como sinônimo.

O interesse em efeitos sinérgicos entre substâncias com vistas às aplicações terapêuticas tem aumentado nos últimos anos em função de recentes mudanças de paradigmas. A busca de ligantes seletivos com um único mecanismo de ação, abordagem mais frequente na busca de candidatos a fármacos, vem cedendo lugar ao desenvolvimento de terapias múltiplas, com o objetivo de atuar simultaneamente sobre diversos alvos terapêuticos e evitar o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos medicamentos.<sup>13,15-17</sup> Essa estratégia é voltada para o tratamento de doenças complexas e multifatoriais, como a aterosclerose e o *diabetes mellitus*. Atualmente, o tratamento de diversas

patologias envolve combinações de medicamentos. Exemplos desta abordagem incluem a terapia da hipertensão arterial, de muitos tipos de câncer e da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS).<sup>5,8,11,13</sup>

A combinação de substâncias com efeito sinérgico pode aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas e/ou reduzir as doses destas. Consequentemente, a toxidez e efeitos adversos diminuem, contribuindo dessa forma para o aumento da eficácia terapêutica.<sup>18</sup> A sinergia pode resultar de dois mecanismos principais: (a) efeitos farmacocinéticos, observados quando uma substância influencia a solubilidade, absorção ou metabolismo de outra, e (b) efeitos farmacodinâmicos, relacionados à atuação simultânea sobre diferentes alvos terapêuticos inter-relacionados.<sup>12,13</sup>

Nesse contexto, as plantas medicinais se reafirmam como potenciais agentes terapêuticos. Seus constituintes frequentemente exibem a capacidade de interagir com proteínas e modular processos celulares envolvidos, por exemplo, na resposta imune, na transdução de sinais, na multiplicação celular e na apoptose. Não é surpreendente, portanto, que misturas destes agentes, ao atuar sobre diversos alvos, produzam efeitos mais potentes que uma única substância.<sup>5,6,8, 19</sup>

Enquanto na estratégia terapêutica ainda dominante são empregadas, isoladamente, substâncias de origem sintética ou natural, na fitoterapia são utilizados extratos de uma única espécie ou combinações de extratos.<sup>19-</sup>

<sup>21</sup> Portanto, os novos paradigmas, que favorecem esquemas terapêuticos de múltiplos componentes, poderão impulsionar a pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. Tais medicamentos incorporam bem esses conceitos, já que são compostos por misturas complexas que contêm, em geral, múltiplas substâncias bioativas.

Entretanto, os estudos de sinergia e outras interações entre componentes de misturas complexas envolvem desafios e exigem a aplicação de métodos diferentes dos tradicionalmente utilizados na pesquisa de produtos naturais. Além disso, a padronização destes produtos requer a aplicação de técnicas que permitam analisar a sua composição global.<sup>19,20,22</sup>

Na presente revisão serão tratados os vários aspectos relativos à sinergia entre produtos do metabolismo secundário através de exemplos relevantes envolvendo substâncias de interesse farmacológico. Adicionalmente, serão discutidos métodos aplicáveis a estudos de sinergia, bem como técnicas que podem ser utilizadas para a padronização e controle de qualidade de extratos vegetais cuja atividade farmacológica se deve a múltiplos componentes.

## 2. Origem evolutiva da sinergia entre metabólitos secundários vegetais

As substâncias de origem vegetal que apresentam atividade farmacológica de interesse são, em geral, metabólitos secundários.<sup>8</sup> Em contraste com o metabolismo primário, relacionado a processos de crescimento e obtenção de energia, comuns a todos os seres vivos, o metabolismo secundário relaciona-se à

produção de substâncias envolvidas na defesa contra predadores e agentes patogênicos e na atração de agentes polinizadores.<sup>8,23,24</sup>

Como as plantas são sésseis, estas desenvolveram um diversificado arsenal químico, através do qual interagem com o meio e se defendem contra ameaças. Portanto, os metabólitos secundários surgiram como resultado da interação dos vegetais com o ambiente e evoluíram ao longo de 140 milhões de anos.<sup>21,23,24</sup>

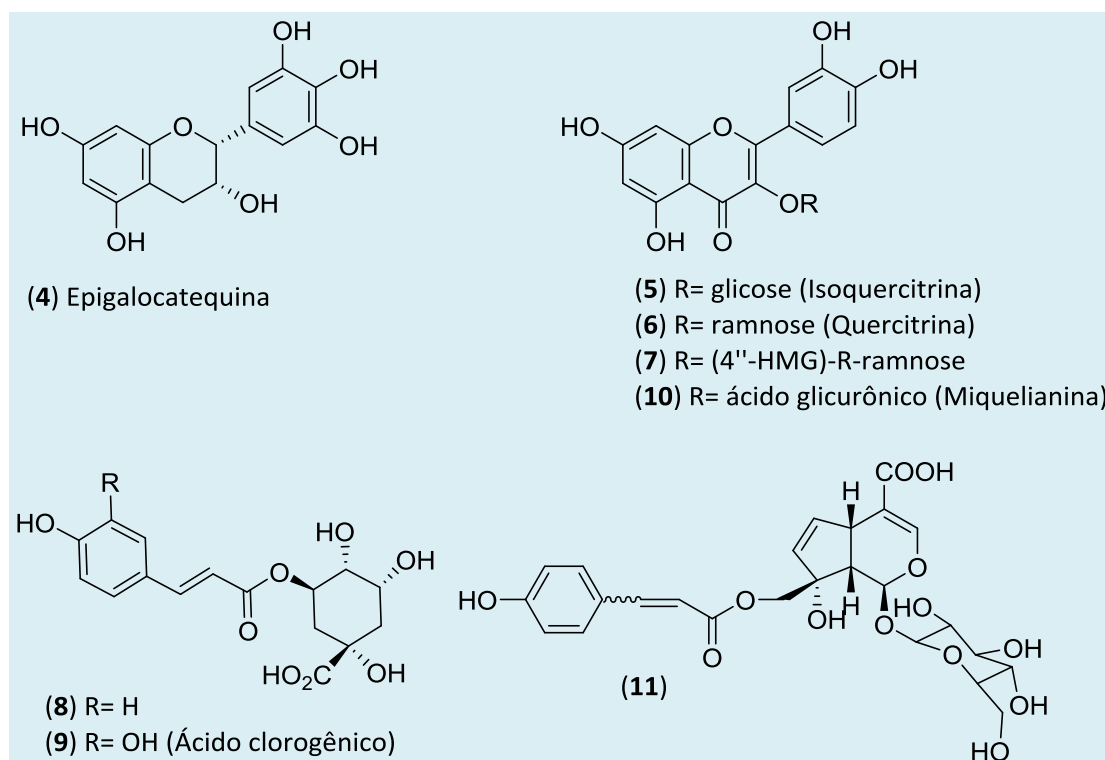
Por se tratarem de agentes de interação entre os vegetais e outros organismos, os metabólitos secundários geralmente exibem atividades biológicas.<sup>23</sup> Com base nestas atividades, é possível classificá-los em dois grupos: substâncias altamente ativas e seletivas; e substâncias fracamente ou moderadamente ativas com atuação sobre múltiplos alvos celulares. As primeiras representam uma minoria e frequentemente pertencem à classe dos alcaloides. É comum a utilização destas substâncias de forma isolada, nos mesmos moldes dos fármacos sintéticos. As substâncias do segundo grupo são predominantes, com uma ampla gama de atividades e ocorrência sob a forma de misturas complexas, normalmente.<sup>8,21,25</sup>

Acredita-se que esta diversidade de substâncias com amplo espectro de atividades proporcione vantagens evolutivas às plantas, já que ampliam suas chances de proteção contra vários agentes nocivos.<sup>5,6,8,21,25</sup> Como os processos bioquímicos envolvem múltiplos alvos e moléculas sinalizadoras, que direcionam as respostas biológicas, é razoável que as plantas produzam grupos de agentes com potencial ação efetora sinérgica.<sup>6,8,21</sup>

De fato, as plantas frequentemente respondem a fatores de estresse aumentando a biossíntese de grupos de substâncias ao invés de um único metabólito secundário.<sup>8</sup> O estudo de Koskimäki *et al.*<sup>26</sup> exemplifica isso. Nesse trabalho, observou-se que a espécie *Vaccinium myrtillus* L. (mirtilo) aumenta a produção de substâncias fenólicas de diversas classes em resposta às infecções.

Acompanhou-se a expressão gênica de enzimas relacionadas à biossíntese de flavonoides e o acúmulo de substâncias fenólicas em resposta às infecções causadas por um fungo endofítico e outro patogênico. O fungo endofítico (*Parapheosphaeria* sp.) aumentou a biossíntese de epigalocatequina

(4), glicosídeos da quercetina (5-7), ácido cumaroilquínico (8) e ácido clorogênico (9), enquanto a infecção pelo fungo patogênico (*Bortrytis cinerea*) aumentou a produção de quercetina-3-glucuronídeo (10) e de um cumaroil-iridoide (11). As estruturas dessas substâncias são mostradas na Figura 4.



**Figura 4.** Substâncias produzidas por *Vaccinium myrtillus* L. em resposta a fungo endofítico ou patogênico

A produção de uma mistura de substâncias com diferentes mecanismos e perfis de atividade representa para o vegetal uma forma de contornar o desenvolvimento de resistência por parte dos agentes predadores ou patogênicos.<sup>8,21,27,28</sup> Adicionalmente, parece existir uma relação custo-benefício vantajosa na biossíntese de misturas de pequenas moléculas a partir de esqueletos simples, que se difundem facilmente, atingindo um maior número de alvos.<sup>25</sup>

Estima-se que 90% das plantas medicinais descritas contenham misturas complexas de substâncias bioativas com atividade fraca ou moderada, ao invés de um restrito número

de substâncias altamente ativas. Tais substâncias pertencem, em sua maioria, às classes dos flavonoides, cumarinas, lignanas, taninos e terpenos, que frequentemente produzem efeitos farmacológicos mensuráveis como resultado de interações sinérgicas, com atuação em múltiplos alvos.<sup>5,8</sup>

### 3. Interações sinérgicas em produtos naturais bioativos

#### 3.1. Sinergia entre componentes de uma espécie medicinal



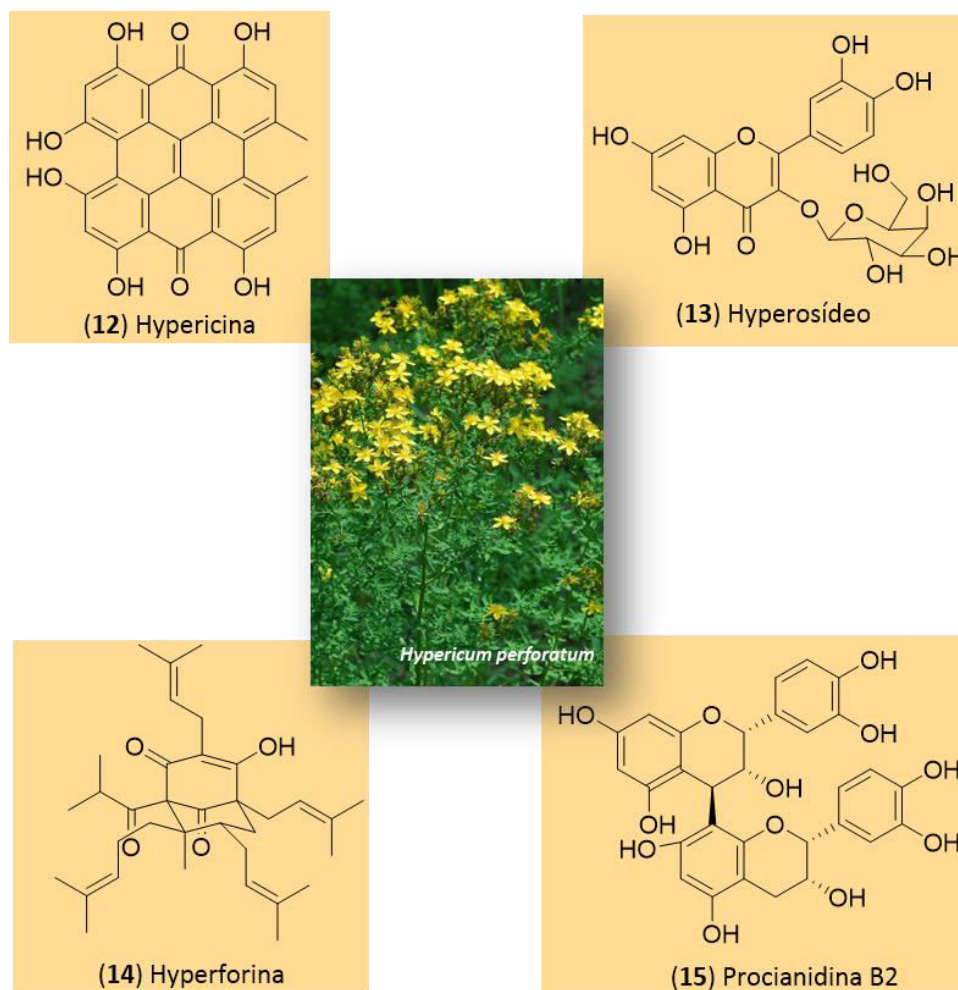
A erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum* L.), largamente utilizada como fitoterápico, tem sido objeto de vários estudos de sinergia entre componentes de extratos vegetais. Formas farmacêuticas líquidas e sólidas, preparadas a partir do extrato hidroalcoólico de partes aéreas na fase de floração, estão disponíveis comercialmente em diversos países, inclusive no Brasil, para o tratamento de depressão.<sup>29</sup> Mais de 50 estudos clínicos comprovaram a eficácia desses extratos (600-900 mg por dia) em pacientes com depressão.<sup>29</sup> A eficácia comparável à dos antidepressivos usuais na clínica (inibidores da recaptura de neurotransmissores monoamínicos), bem como o menor índice de efeitos adversos, fizeram da erva-de-são-joão um fitoterápico frequentemente prescrito, sobretudo na Alemanha e nos Estados Unidos.<sup>30</sup>

Nahrstedt & Butterweck<sup>29</sup> evidenciaram, em estudos *in vivo*, que substâncias pertencentes a diferentes classes químicas são responsáveis pela atividade antidepressiva da erva-de-são-joão. Destacam-se a naftodiantrona hypericina (**12**), que atua presumivelmente como inibidor da recaptura de monoaminas, e os flavonoides hyperosídeo (**13**), isoquercitrina (**5**) e miquelianina (**10**), que possivelmente exercem seus efeitos por meio da regulação da secreção de acetilcolina e cortisol. Estudos *in vitro* corroboram essa hipótese mostrando que essas substâncias (**5**, **10**, **12** e **13**), além da hyperforina (**14**) e de outras, atuam em conjunto em múltiplos alvos do sistema nervoso central.<sup>31</sup> Observou-se, ainda, que as procianidinas presentes no extrato, desprovidas de ação antidepressiva, são capazes de potencializar a ação da hypericina. O mecanismo proposto para esse efeito sinérgico é o aumento da solubilidade em água da hypericina em presença destas procianidinas, com destaque para a procianidina B2 (**15**), que se traduz em um aumento considerável (140-160%) na biodisponibilidade da primeira.<sup>29</sup> Esse é um exemplo típico de sinergia farmacocinética.

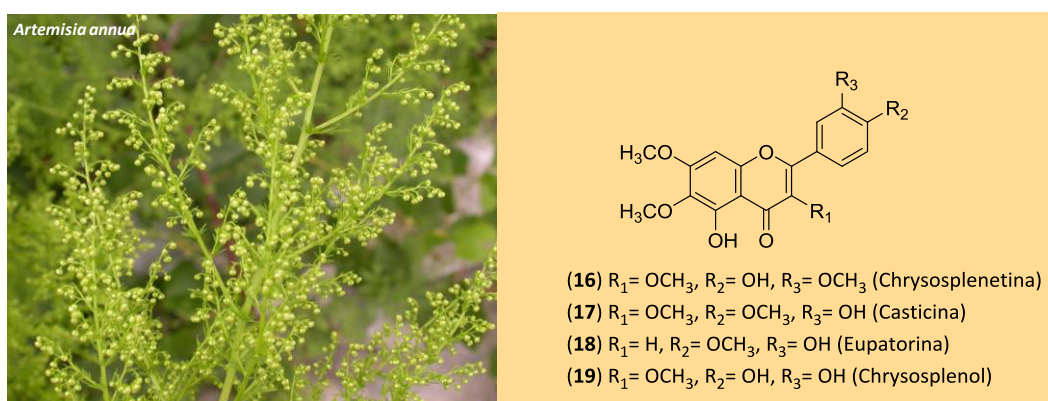
Na Figura 5 são mostradas as estruturas de algumas das substâncias que contribuem para o efeito antidepressivo da erva-de-são-joão.

Outro relevante caso de sinergia foi constatado entre a artemisinina (Figura 2) e outros constituintes químicos da espécie medicinal *Artemisia annua* L. A artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada desta espécie, é atualmente o principal componente de tratamentos contra malária causada por *Plasmodium spp.* resistentes à cloroquina. Entretanto, o surgimento de cepas resistentes a esse fármaco é observado com crescente preocupação.<sup>10,33,34</sup>

A resistência a fármacos isolados, como a cloroquina e a própria artemisinina, é uma ocorrência comum. Porém, esse não parece ser um problema no tratamento com extratos de plantas medicinais, como a *Artemisia annua*, utilizada na Ásia há milhares de anos para o tratamento de malária. Estudos evidenciaram que a concentração de artemisinina presente em extratos é baixa se comparada a doses clinicamente recomendadas da substância. Ainda assim, os extratos podem se mostrar mais efetivos que a substância isolada.<sup>27,35</sup> Para explicar este fato, propõe-se que flavonoides metoxilados atuem sinergicamente potencializando a ação da artemisinina (**2**).<sup>27</sup> Conforme observado por Bilia *et al.*<sup>36</sup>, esses flavonoides (**16-19**) aumentam a velocidade de reação entre a artemisinina e a hemina, um produto da digestão parasitária da hemoglobina, levando à liberação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela destruição dos plasmódios. Além disso, é possível que esses flavonoides tenham ação inibitória sobre bombas de efluxo da membrana celular, um mecanismo que permitiria aos extratos contornar o fenômeno da resistência.<sup>27</sup> As estruturas de alguns flavonoides presentes na espécie são mostradas na Figura 6.



**Figura 5.** A erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum* L.) e alguns de seus constituintes ativos [Foto: Copyright © 2016 Steve R. Turner<sup>32</sup>]



**Figura 6.** *Artemisia annua* L. e alguns de seus flavonoides metoxilados [Foto: Copyright © 2016 Gerrit Davidse<sup>37</sup>]



### 3.2. Sinergia em combinações de extratos vegetais

Uma prática frequente na medicina tradicional é a combinação de extratos vegetais para o tratamento de doenças.<sup>11,16</sup> Nos últimos anos, a eficácia dessas preparações medicinais complexas tem sido alvo de estudos. Muitos deles estão voltados para a comprovação da eficácia de preparações da medicina chinesa, conforme relatado em recentes revisões sobre o tema.<sup>16,38</sup> Assim, observou-se que as raízes das espécies medicinais *Astragalus membranaceus* Moench (Fabaceae) e *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. & C.A. Mey. (Scrophulariaceae), conhecidas como *Astragali Radix* e *Rehmanniae Radix*, constituintes de uma preparação da medicina tradicional chinesa para a cicatrização de feridas, não apresentam atividade cicatrizante *in vivo* quando administradas separadamente, porém, são ativas quando combinadas.<sup>39</sup>

Estudos semelhantes são possíveis para preparações mais complexas. Um exemplo clássico é o fitoterápico Iberogast®, licenciado na Alemanha e em outros países europeus para o tratamento de distúrbios digestivos. Tal medicamento consiste de uma combinação fixa de extratos de nove espécies medicinais: *Iberis amara* L. (Brassicaceae), *Angelica archangelica* L. (Apiaceae), *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), *Carum carvi* L. (Apiaceae), *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae), *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) e *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae).<sup>40,41</sup> O Iberogast® encontra-se comercialmente disponível na Alemanha desde 1961. Pesquisas realizadas nos últimos anos comprovaram que a formulação apresenta eficácia equivalente à de fármacos sintéticos (cisaprida e metoclopramida) utilizados para tratar doenças gastrointestinais.<sup>40</sup>

Estudos mostraram que cada extrato apresenta ação farmacológica relevante e contribui para os efeitos totais do Iberogast®,

conforme mostrado na Figura 7. Acredita-se que estes efeitos sejam resultantes da ação sinérgica de múltiplos componentes sobre diferentes alvos. Foram identificadas nesses extratos 350 substâncias, dentre as quais 200 apresentam atividade farmacológica conhecida. As principais classes de metabólitos secundários presentes são terpenos, cumarinas, flavonoides e ácidos fenólicos.<sup>40</sup> Essas substâncias contribuem, presumivelmente, para a ação do Iberogast® por três mecanismos: modulação da motilidade intestinal, ação anti-inflamatória e atividade antioxidante.<sup>40,41</sup>

### 3.3. Sinergia entre produtos naturais e fármacos de uso clínico

Algumas substâncias de origem natural podem atuar de forma sinérgica com fármacos já utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, conseqüentemente, minimizando os efeitos adversos.<sup>5</sup> Os resultados do estudo de Nagaprashantha *et al.*<sup>43</sup> constituem um exemplo relevante deste tipo de interação. Nesse estudo, os autores demonstraram o efeito sinérgico entre o fármaco docetaxel (**20**), um derivado semissintético do taxol, empregado no tratamento de câncer de próstata, e o flavonoide vicenina-2 (**21**) (Figura 8). Os esquemas de tratamento atual com esse medicamento implicam em administração intravenosa de doses que variam de 60 a 100 mg/m<sup>2</sup> uma vez a cada três semanas.<sup>43,44</sup> Efeitos adversos ocorrem em 67% dos casos, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes. Observou-se nesse estudo que a vicenina-2, isoladamente, pode inibir a proliferação das células tumorais por diversos mecanismos. A coadministração do flavonoide e de docetaxel a camundongos, por via oral, permitiu observar potentes efeitos inibitórios sobre as células tumorais. As doses administradas em dias alternados foram 0,03 mg/m<sup>2</sup> de docetaxel e 3 mg/m<sup>2</sup> de vicenina-2. Os mecanismos envolvidos provavelmente

estão relacionados à atuação das substâncias em diferentes alvos.

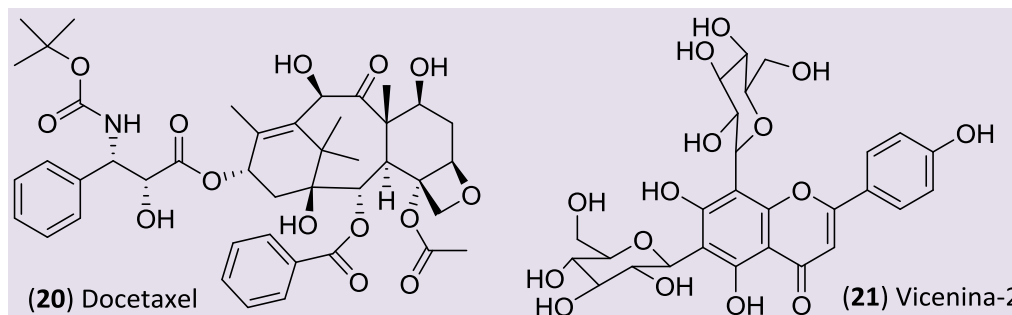
Recentemente, um estudo semelhante relatou a interação sinérgica *in vitro* entre taxol e o flavonoide metoxilado nobiletina em linhagens de células de carcinoma pulmonar. Adicionalmente, a administração

da nobiletina (**22**) a camundongos por via oral (600 µg em suspensão) associada ao regime quimioterápico de paclitaxel (taxol) e carboplatina (via intraperitoneal) mostrou-se mais eficiente que a quimioterapia na ausência deste flavonoide.<sup>45</sup> A estrutura deste flavonoide é mostrada na Figura 9.

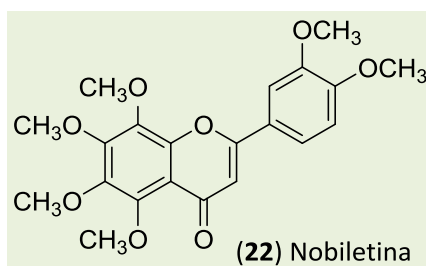
Espécies vegetais de Iberogast®	Efeitos das espécies vegetais de Iberogast® em doenças gastrointestinais					
	Atonia		Espasmos	Secreção de ácido	Úlcera/inflamação	Produção de radicais livres
	↓ Motilidade	↑ Motilidade				
<i>Iberis amara</i>						
<i>Angelica archangelica</i>						
<i>Carum carvi</i>						
<i>Silybum marianum</i>						
<i>Chelidonium majus</i>						
<i>Glycyrrhiza glabra</i>						
<i>Matricaria recutita</i>						
<i>Melissa officinalis</i>						
<i>Mentha piperita</i>						

Sem atividade
  Atividade moderada
  Atividade alta

**Figura 7.** Atividade individual dos extratos que compõem o Iberogast® sobre fatores relacionados aos distúrbios gastrointestinais (adaptado de Wagner<sup>42</sup>)



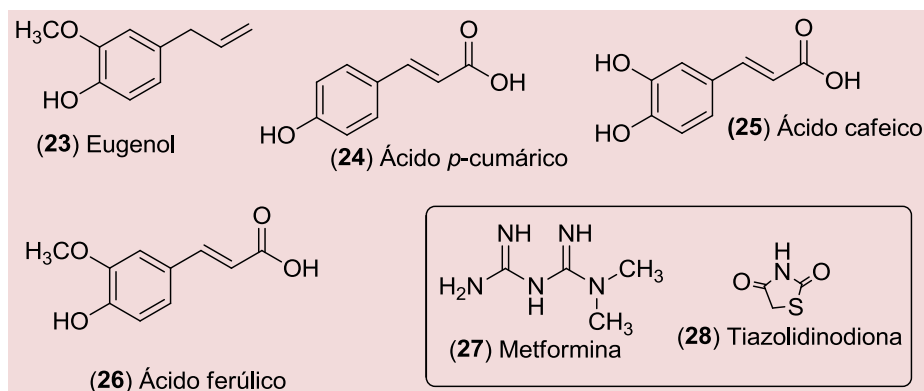
**Figura 8.** Estruturas químicas do docetaxel e da vicenina-2



**Figura 9.** Estrutura do flavonoide polimetoxilado nobiletina

Outro exemplo é a interação entre derivados do ácido cinâmico e hipoglicemiantes orais. Prabhakar & Doble<sup>46</sup> observaram que o eugenol (23) e os ácidos *p*-cumárico (24), cafeico (25), clorogênico (9) e ferúlico (26) interagem sinergicamente com dois hipoglicemiantes orais, a metformina (27) e a tiazolidinodiona (28) (Figura 10). Esta interação resulta na redução da concentração de medicamento necessária para obter o

efeito desejado de captação da glicose *in vitro*. Os autores constataram que estas substâncias fenólicas auxiliam a captação de glicose pelas células por mecanismos diferentes: enquanto o ácido clorogênico atua aumentando a expressão de transportadores de glicose (GLUT-4) na membrana celular, os demais ácidos fenólicos atuam estimulando diretamente a cascata de sinalização da insulina.



**Figura 10.** Estruturas de substâncias fenólicas e de fármacos que atuam sinergicamente sobre a captação celular de glicose

Entretanto, é importante ressaltar que a combinação de produtos naturais com fármacos sintéticos pode produzir efeitos deletérios. Por exemplo, extratos de *Hypericum perforatum* podem reduzir a biodisponibilidade de ciclosporina e diversos antineoplásicos por induzir enzimas da família citocromo P450, responsáveis pelo metabolismo de diversos medicamentos.<sup>22,47</sup>

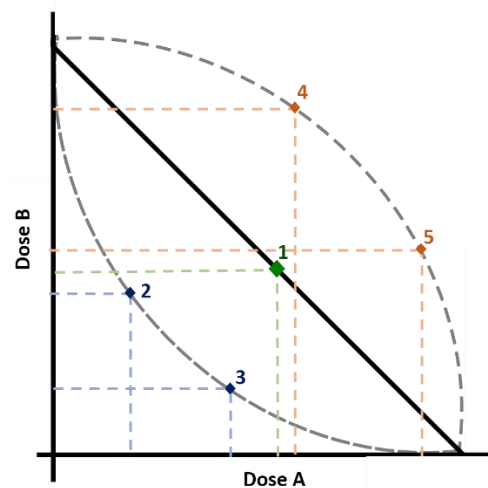
#### 4. Estratégias para estudos de sinergia

Um dos métodos mais utilizados para determinar a interação entre compostos é a construção de diagramas denominados isobologramas, conforme será explicado mais adiante.<sup>48</sup> O uso desta estratégia tem sido documentado desde 1870.<sup>18</sup> Podem ser utilizados modelos farmacológicos *in vivo* ou

*in vitro* para demonstrar os efeitos de duas substâncias combinadas em diferentes proporções.

Para construir um isoblograma, inicialmente é preciso testar as substâncias individualmente, em diferentes doses. Esses dados são utilizados para calcular as combinações de doses necessárias para produzir determinado efeito na ausência hipotética de interações. Os pares de doses calculados dessa forma são representados por pontos em um eixo cartesiano, originando uma isóbola, conforme mostrado na Figura 11. O próximo passo é avaliar o efeito de combinações de doses das substâncias, visando estabelecer as reais proporções necessárias para produzir o efeito esperado. Quando esses pares de doses,

determinados experimentalmente, são plotados no eixo cartesiano, três situações são possíveis: 1) se não houver interação, mas simplesmente um efeito aditivo, as combinações originarão pontos pertencentes à isóbola, como o ponto 1; 2) quando o efeito da combinação de substâncias é superior à soma dos efeitos destas isoladamente, caracterizando uma interação sinérgica, os pontos ficarão abaixo da isóbola, como os pontos 2 e 3; 3) por outro lado, se o efeito da mistura de substâncias for inferior ao esperado com base no somatório dos efeitos de seus constituintes isolados, o que caracteriza o antagonismo, os pontos ficarão acima da isóbola, como os pontos 4 e 5.<sup>48,49</sup> Essas três possibilidades de interação estão mostradas na Figura 11.



**Figura 11.** Isoblograma representando interações aditivas (interação zero; **ponto 1**) interações sinérgicas (**pontos 2 e 3**), ou antagonismo (**pontos 4 e 5**) entre substâncias hipotéticas **A** e **B** (adaptado de CHOU 49)

Outra abordagem possível é a construção de uma curva dose-resposta para um composto na ausência e na presença de uma dose fixa de outro.<sup>8</sup>

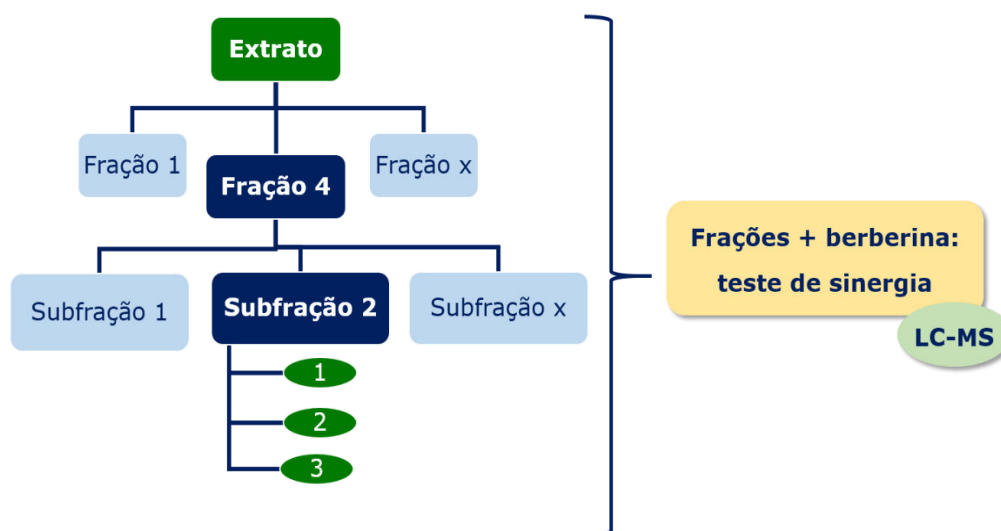
Entretanto, esses métodos não são adequados para avaliar efeitos sinérgicos em misturas complexas, como é o caso dos extratos vegetais. Para contornar o problema, Efferth & Koch<sup>8</sup> propõem a identificação e quantificação dos princípios ativos presentes para que estes sejam

testados separadamente, nas concentrações/doses em que estão presentes no extrato. Se o efeito produzido pelo extrato for superior aos efeitos de seus constituintes ativos nessas condições, evidencia-se a contribuição de outras substâncias. Todavia, a identificação das substâncias que atuam sinérgicamente continua sendo um desafio. Recentemente técnicas computacionais têm sido desenvolvidas e empregadas com essa finalidade. A triagem *in silico* de uma

determinada substância sobre modelos farmacofóricos mostrou-se uma ferramenta útil para prever interações sinérgicas entre metabólitos secundários e compreender possíveis mecanismos responsáveis por estas, conforme foi demonstrado por Li *et al.*<sup>50</sup> e Wang *et al.*<sup>51</sup>

Adicionalmente, Junio *et al.*<sup>4</sup> propuseram o fracionamento guiado por sinergia (“synergy-directed fractionation”), que se tornou uma interessante abordagem para identificar substâncias que atuam sinergicamente em extratos. Assim, os autores realizaram o fracionamento do

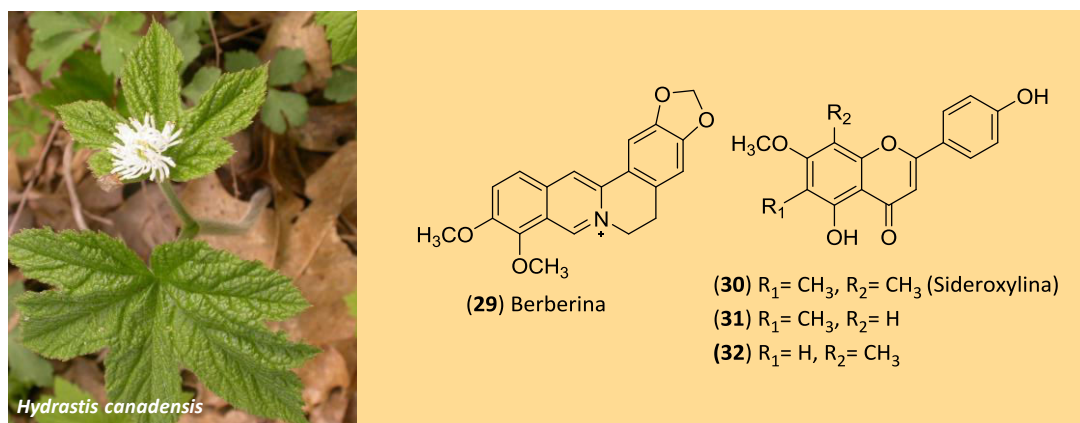
extrato metanólico de folhas da espécie medicinal *Hydrastis canadensis* L. (Ranunculaceae), cujas propriedades antimicrobianas são atribuídas, em parte, ao alcaloide berberina. As frações obtidas foram sucessivamente testadas *in vitro* em combinação com berberina (**29**) em diferentes concentrações para a construção de isobologramas. As frações em que se observaram efeitos antimicrobianos sinérgicos foram analisadas por LC-MS e novamente fracionadas. Na Figura 12 é mostrado um diagrama esquemático desta estratégia de estudo.



**Figura 12.** Diagrama representativo do fracionamento guiado por sinergia desenvolvido por Junio *et al.*<sup>4</sup>

Essa estratégia possibilitou identificar três flavonoides metilados (**30-32**) que atuam sinergicamente com a berberina, mostrados na Figura 13. Separadamente, esses flavonoides não apresentam atividade

antimicrobiana. O mecanismo responsável pelo efeito sinérgico é a inibição de bombas de efluxo, permitindo o aumento da concentração de berberina no interior das células bacterianas.

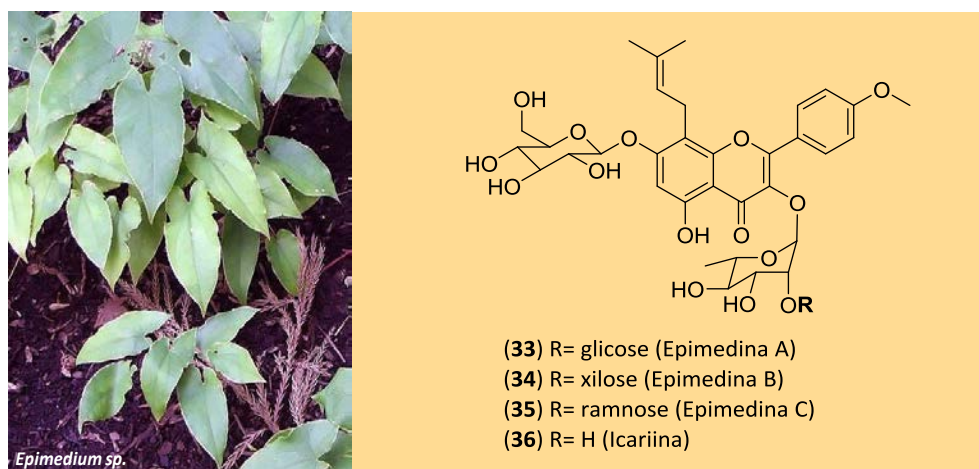


**Figura 13.** Estruturas do alcaloide berberina e dos flavonoides metilados de *Hydrastis canadensis* L. [Foto: Copyright © 2016 Gerrit Davidse<sup>52</sup>]

Essa estratégia pode ser empregada para a identificação de compostos que atuam sinergicamente com substâncias ativas previamente identificadas em extratos, auxiliando a esclarecer os casos em que estas respondem somente de forma parcial pela atividade biológica da mistura.

Outra ferramenta potencialmente útil para estabelecer a contribuição de substâncias para o efeito de um extrato e possíveis interações entre elas foi descrita recentemente por Jin *et al.*<sup>53</sup> Nesse trabalho, os autores avaliaram a atividade do extrato hidroalcoólico de *Herba Epimedii*, uma preparação da medicina tradicional chinesa composta por partes aéreas de espécies do gênero *Epimedium* L. (Berberidaceae), sobre

a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Os autores identificaram as substâncias bioativas e determinaram a contribuição destas para o efeito global do extrato por meio da separação e remoção de substâncias (“fishing and knocking out”) previamente detectadas. Inicialmente, foi realizado o tratamento de osteoblastos com o extrato bruto de *Herba Epimedii*. As células tratadas foram lisadas e o extrato celular obtido foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) para detectar substâncias capazes de penetrar a membrana celular. Dessa forma, foram identificados quatro flavonoides isoprenilados e glicosilados **33-36**, potencialmente bioativos (Figura 14).

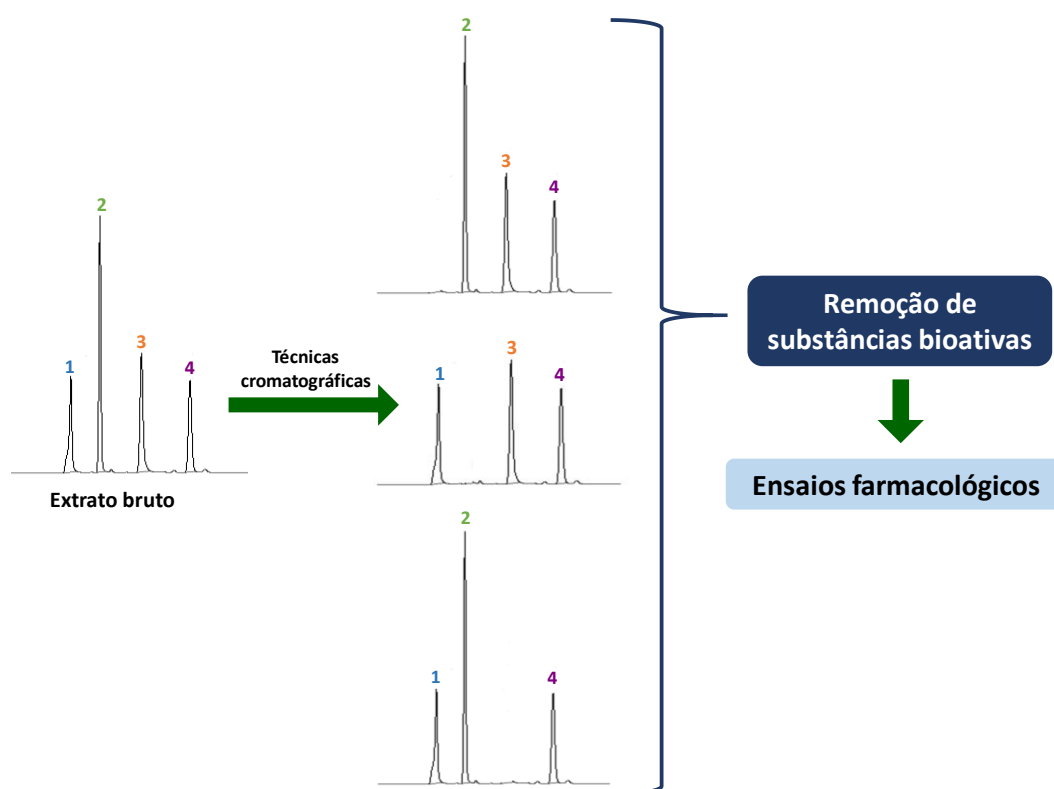


**Figura 14.** Estruturas de flavonoides detectados em *Herba Epimedii* [Foto: Copyright © Copyright © 2016 David Stang<sup>54</sup>]



Em uma etapa subsequente, os pesquisadores utilizaram técnicas de cromatografia contracorrente e CLAE em escala preparativa para remover e isolar do extrato bruto cada uma dessas substâncias. Ensaios realizados separadamente com cada substância e com o material remanescente do extrato permitiram estabelecer a contribuição de cada uma para o efeito global da mistura. Testou-se também o efeito da mistura das quatro substâncias e do restante

do extrato após a remoção destas. A análise dos dados obtidos na avaliação dos pares constituídos de substância(s)/material remanescente permitiram comprovar que os flavonoides identificados são os principais responsáveis pela atividade estimuladora do extrato sobre osteoblastos, assim como evidenciar a existência de interações entre as substâncias.<sup>53</sup> Na Figura 15 é mostrado um diagrama esquemático desta estratégia.



**Figura 15.** Diagrama esquemático da separação e remoção de substâncias (“fishing and knocking out”), desenvolvida por Jin *et al.*, 2013 (adaptado de Jin *et al.*)<sup>53</sup>

Conforme abordado na revisão de Ulrich-Merzenich *et al.*,<sup>22</sup> as ciências “ômicas”, tais como a genômica, a proteômica e a metabolômica, apresentam grande potencial como ferramentas para a compreensão de interações sinérgicas entre componentes de misturas complexas, auxiliando na identificação de mecanismos de ação destas substâncias e na padronização dos extratos. O uso destas técnicas visando compreender a atuação de plantas da medicina tradicional

chinesa sobre sistemas biológicos foi revisado por Buriani *et al.*<sup>55</sup> Apesar dos avanços na área, o estudo de interações sinérgicas através de abordagens integradas, que permitam analisar a complexa interação entre o genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma, constituem ainda um grande desafio e não serão discutidas na presente revisão.<sup>22,55</sup>

## 5. Controle de qualidade de fitoterápicos que atuam por efeitos sinérgicos

A padronização e o controle de qualidade de extratos vegetais empregados na produção de fitoterápicos são essenciais para assegurar a segurança e a reprodutibilidade dos efeitos biológicos já que sua composição química pode sofrer variações em função de fatores climáticos e ambientais.<sup>56</sup> Atualmente, tais processos se baseiam, em geral, na identificação e quantificação de alguns marcadores químicos. Todavia, levando em consideração que, conforme discutido em tópicos anteriores, os efeitos de um grande número de fitopreparações são decorrentes da atuação sinérgica de múltiplos componentes e não de uma única substância, essa abordagem não se mostra adequada, já que não fornece informações quanto à composição química global destas preparações.<sup>56,57</sup>

Embora a composição química de extratos vegetais seja complexa, compreendendo algumas centenas de substâncias, muitas vezes em baixas concentrações, é importante que o controle de qualidade leve em consideração o maior número possível de constituintes, pelo menos nos casos em que o potencial terapêutico está relacionado à sinergia entre componentes.<sup>58</sup> A incorporação de técnicas de padronização que se baseiam na composição química global de misturas permite estabelecer um “fingerprint” metabólico de tais produtos.<sup>57,59</sup>

Atualmente, técnicas cromatográficas e espectroscópicas têm sido estudadas para essa finalidade, tais como espectroscopia na região do infravermelho, cromatografia em fase gasosa ou em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>56,57,60</sup> A combinação desses métodos analíticos com técnicas quimiométricas, usualmente empregadas em análise metabólica, como Análise de Componentes Principais (*Principal*

*Component Analysis* - PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (*Hierarchical Cluster Analysis* - HCA) permite obter uma vasta gama de informações sem necessariamente identificar todos os componentes dessas misturas complexas.<sup>56</sup>

A espectroscopia por RMN tem sido a técnica mais empregada no estabelecimento do perfil metabólico de extratos vegetais devido a vantagens como rapidez, simplicidade, robustez e reprodutibilidade.<sup>57,59,61,62</sup> Esta técnica fornece um grande número de informações, permitindo identificar e quantificar simultaneamente diversos constituintes de misturas complexas, além de permitir a aplicação de métodos de análise quimiométrica para investigar e comparar a composição total dessas misturas.<sup>57</sup>

Um exemplo relevante de aplicação da RMN com esta finalidade é relatado por Rasmussen *et al.*<sup>63</sup> Os autores utilizaram espectros de <sup>1</sup>H para analisar a composição química de preparações farmacêuticas da erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*). Embora os efeitos benéficos de extratos dessa espécie no tratamento da depressão estejam relacionados a efeitos sinérgicos de diversas classes de substâncias, conforme discutido anteriormente, os métodos preconizados para a padronização destes extratos são baseados no conteúdo total de uma única classe de substâncias, as hypericinas.<sup>63,64</sup> Os autores empregaram PCA para comparar os espectros de <sup>1</sup>H de preparações farmacêuticas de *H. perforatum* provenientes de nove diferentes fabricantes. As amostras analisadas não apresentaram diferenças importantes no conteúdo de hypericinas, enquanto as hyperforinas não foram detectadas. Em contrapartida, foram observadas variações significativas no conteúdo de flavonoides.<sup>63</sup> É provável que substâncias dessa classe tenham participação importante nos efeitos antidepressivos da erva-são-joão (ver o tópico 3), por isso, a eficácia dessas preparações pode variar, mesmo que os extratos tenham sido padronizados com base no conteúdo de

hypericinas.

Outra técnica recentemente avaliada para a análise da composição química de preparações comerciais de *H. perforatum* é a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM).<sup>64</sup> Essa técnica apresenta maior sensibilidade e resolução do que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto o acoplamento à espectrometria de massas permite trabalhar com concentrações muito menores do que as utilizadas em estudos com detecção por RMN.<sup>64,65</sup> Assim como no estudo descrito anteriormente, nesse trabalho a análise das amostras por PCA não permitiu detectar diferenças no conteúdo de hypericinas, porém foram observadas diferenças significativas no conteúdo de flavonoides e nesse caso, também de hyperforinas e ácidos graxos.<sup>64</sup>

Esses exemplos evidenciam a importância da padronização e controle de qualidade de preparações fitoterápicas cuja atividade biológica esteja relacionada a efeitos sinérgicos por métodos que analisem a sua composição como um todo. Ainda, de acordo com Gad *et al.*,<sup>56</sup> diferentes técnicas podem ser combinadas para a obtenção de informações complementares sobre essas misturas complexas.

## 6. Conclusão

Os tópicos discutidos no presente trabalho permitem concluir que os efeitos sinérgicos são a base para a compreensão da atuação da maioria dos extratos vegetais sobre sistemas biológicos. A composição química complexa dos extratos favorece a atuação conjunta sobre múltiplos alvos celulares e moleculares, conduzindo a efeitos biológicos mensuráveis. Esses efeitos, que podem ser observados tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, podem ser explorados no desenvolvimento de medicamentos e/ou

estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento de patologias, sobretudo aquelas de caráter multifatorial.

Entretanto, para que tais efeitos sejam compreendidos, é necessário que métodos de estudos apropriados sejam empregados, já que os métodos clássicos, baseados na purificação e isolamento de substâncias ativas, embora úteis para a obtenção de conhecimentos preliminares, não permitem a caracterização e compreensão de efeitos sinérgicos.

Além disso, nos casos em que os efeitos biológicos de extratos vegetais ou combinações destes resultam de sinergia, para que estes originem medicamentos fitoterápicos seguros e reprodutíveis do ponto de vista farmacológico e toxicológico, é necessário que as etapas de padronização e controle de qualidade sejam baseadas em sua composição química total. Estudos recentes têm apontado algumas técnicas cromatográficas e espectroscópicas adequadas para essa finalidade. Espera-se que nos próximos anos, o aprimoramento das estratégias de estudo de sinergia, bem como de técnicas analíticas para misturas complexas permitam explorar melhor o potencial terapêutico das plantas medicinais.

## Agradecimentos

L. M. Casanova agradece ao CNPq pela bolsa de doutorado.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* **2001**, *109*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>2</sup> Balunas, M. J.; Kinghorn, D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* **2005**, *78*, 431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30

- years from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *69*, 629. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Junio, H. A.; Sy-Cordero, A. A.; Ettefagh, K. A.; Burns, J. T.; Micko, K. T.; Graf, T. N.; Richter, S. J.; Cannon, R. E.; Oberlies, N. H.; Cech, N. B. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Journal of Natural Products* **2011**, *74*, 1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>5</sup> Carmona, F.; Pereira, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, *23*, 379. [[CrossRef](#)]
- <sup>6</sup> Niemeyer, K.; Bell, I. R.; Koithan, M. Traditional knowledge of western herbal medicine and complex systems science. *Journal of Herbal Medicine* **2013**, *3*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Berkov, S.; Georgieva, L.; Kondakova, V.; Atanassov, A.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2009**, *23*, 1170. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> Efferth, T.; Koch, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Current Drug Targets* **2011**, *12*, 122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Malik, S.; Cusidó, R. M.; Mirjalili, M. H.; Moyano, E.; Palazón, J.; Bonfill, M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 23. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Miller, L. H.; Ackerman, H. C.; Su, X.-z.; Wellems, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine* **2013**, *19*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Williamson, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Ma, X. H.; Zheng, C. J.; Han, L. Y.; Xie, B.; Jia, J.; Cao, Z. W.; Li, Y. X.; Chen, Y. Z. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Eid, S. Y.; El-Readi, M. Z.; Winka, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Jia, J.; Zhu, F.; Ma, X.; Cao, Z. W.; Li, Y. X.; Chen, Y. Z. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8*, 111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Che, C.-T.; Wang, Z. J.; Chow, M. S. S.; Lam, C. W. K. Herb-Herb combination for therapeutic enhancement and advancement: theory, practice and future perspectives. *Molecules* **2013**, *18*, 5125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Yang, Y.; Zhang, Z.; Li, S.; Ye, X.; Li, X.; He, K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* **2014**, *92*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> van Vuuren, S.; Viljoen, A. Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica* **2011**, *77*, 1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Leonti, M.; Casu, L. Traditional medicines and globalization: current and future perspectives in ethnopharmacology. *Frontiers in Pharmacology* **2013**, *4*, epub. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Wagner, H. Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. *Archive for Organic Chemistry* **2004**, *2004*, 277. [[Link](#)]
- <sup>21</sup> Wink, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures in phytomedicine. *Current Drug Metabolism* **2008**, *9*, 996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>22</sup> Ulrich-Merzenich, G.; Panek, D.; Zeitler, H.; Wagner, H.; Vetter, H. New perspectives for synergy research with the “omic”-

- technologies. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 495. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>23</sup> Mors, W. The demystification of phytotherapy. *Interciencia* **1988**, *13*, 223.
- <sup>24</sup> Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 3. [CrossRef]
- <sup>25</sup> Gertsch, J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta Medica* **2011**, *77*, 1086. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>26</sup> Koskimäki, J. J.; Hokkanen, J.; Jaakola, L.; Suorsa, M.; Tolonen, A.; Mattila, S.; Pirttilä, A. M.; Hohtola, A. Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology* **2009**, *125*, 629. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Rasoanaivo, P.; Wright, C. W.; Willcox, M. L.; Gilbert, B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria Journal* **2011**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>28</sup> Zonyane, S.; Van Vuuren, S. F.; Makunga, N. P. Antimicrobial interactions of Khoi-Sanpoly-herbal remedies with emphasis on the combination; *Agathos macrenulata*, *Dodonaea viscosa* and *Eucalyptus globulus*. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *148*, 144. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>29</sup> Nahrstedt, A.; Butterweck, V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort. *Journal of Natural Products* **2010**, *73*, 1015. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>30</sup> Clauson, K. A.; Santamarina, M. L.; Rutledge, J. C. Clinically relevant safety issues associated with St. John's wort product labels. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2008**, *8*, 42. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>31</sup> Simmen, U.; Higelin, J.; Berger-Büter, K.; Schaffner, W.; Lundstrom, K. Neurochemical studies with St. John's wort *in vitro*. *Pharmacopsychiatry* **2001**, *Suplement 1*, S137. [PubMed]
- <sup>32</sup> <http://www.tropicos.org/Image/100308134> - Acesso em 06 abril 2016.
- <sup>33</sup> Brown, G. D. The biosynthesis of artemisinin (qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (qinghao). *Molecules* **2010**, *15*, 7603. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>34</sup> Wongsrichanalai, C.; Sibley, C. H. Fighting drug-resistant *Plasmodium falciparum*: the challenge of artemisinin resistance. *Clinical Microbiology and Infection* **2012**, *19*, 908. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>35</sup> Van der Kooy, F.; Verpoorte, R.; Meyer, J. J. M. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. *South African Journal of Botany* **2013**, *74*, 186. [CrossRef]
- <sup>36</sup> Bilia, A. R.; Lazari, D.; Messori, L.; Taglioli, V.; Temperini, C.; Vincieri, F. F. Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin - Its application to *Artemisia annua* constituents. *Life Sciences* **2002**, *70*, 769. [CrossRef]
- <sup>37</sup> <http://www.tropicos.org/Image/83128> - Acesso em 06 de abril 2016.
- <sup>38</sup> Wang, Z.; Liu, J.; Cheng, Y.; Wang, Y. Fangjiomics: in search of effective and safe combination therapies. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2011**, *51*, 1132. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>39</sup> Lau, K.-M.; Lai, K.-K.; Liu, C.-L.; Tam, J. C.-W.; To, M.-H.; Kwok, H.-F.; Lau, C.-P.; Ko, C.-H.; Leung, P.-C.; Fung, K.-P.; Poon, S. K.-S.; Lau, C. B.-S. Synergistic interaction between *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *141*, 250. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>40</sup> Wegener, T.; Wagner, H. The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast®). *Phytomedicine* **2006**, *SV*, 20. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>41</sup> Krueger, D.; Gruber, L.; Buhner, S.; Zeller, F.; Langer, R.; Seidl, S.; Michel, K.; Schemann, M. The multi-herbal drug STW 5 (Iberogast®) has prosecretory action in the human intestine. *Neurogastroenterology & Motility* **2009**, *21*, 1203. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>42</sup> Wagner, H. Multitarget therapy – The future of treatment formore than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 122. [CrossRef] [PubMed]



- <sup>43</sup> Nagaprashantha, L. D.; Vatsyayan, R.; Singhal, J.; Fast, S.; Roby, R.; Awasthi, S.; Singhal, S. S. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *82*, 1100. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>44</sup> Nishiyama, M.; Wada, S. Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* **2009**, *12*, 132. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>45</sup> Uesato, S.; Yamashita, H.; Maeda, R.; Hirata, Y.; Yamamoto, M.; Matsue, S.; Nagaoka, Y.; Shibano, M.; Taniguchi, M.; Baba, K.; Ju-ichi, M. Synergistic antitumor effect of a combination of paclitaxel and carboplatin with nobiletin from *Citrus depressa* on non-small-cell lung cancer cell lines. *Planta Medica* **2014**, *80*, 452. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>46</sup> Prabhakar, P. K.; Doble, M. Interaction of cinnamic acid derivatives with commercial hypoglycemic drugs on 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 9835. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>47</sup> Borrelli, F.; Izzo, A. A. Herb–drug interactions with St John’s Wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *The AAPS Journal* **2009**, *11*, 710. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>48</sup> Tallarida, R. J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2012**, *342*, 2. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>49</sup> Chou, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 621. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>50</sup> Li, S.; Zhang, B.; Zhang, N. Network target for screening synergistic drug combinations with application to traditional Chinese medicine. *BMC Systems Biology* **2011**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>51</sup> Wang, X.; Xu, X.; Tao, W.; Li, Y.; Wang, Y.; Yang, L. A systems biology approach to uncovering pharmacological synergy in herbal medicines with applications to cardiovascular disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 2012. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>52</sup> <http://www.tropicos.org/Image/10030909> 5 - Acesso em 06 abril 2016.
- <sup>53</sup> Jin, J.; Li, Y.; Tanui, E. K.; Han, L.; Jia, Y.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, Y. Fishing and knock out of bioactive compounds using a combination of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) and preparative HPLC for evaluating the holistic efficacy and interaction of the components of *Herba Epimedii*. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *147*, 357. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>54</sup> <http://www.tropicos.org/Image/10011268> 1 - Acesso em 06 de abril 2016
- <sup>55</sup> Buriani, A.; Garcia-Bermejo, M. L.; Bosisio, E.; Xu, Q.; Li, H.; Dong, X.; Simmonds, M. S. J.; Carrara, M.; Tejedor, N.; Lucio-Cazana, J.; Hylands, P. J. Omic techniques in systems biology approaches to traditional Chinese medicine research: Present and future. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *140*, 535. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>56</sup> Gad, H. A.; El-Ahmady, S. H.; Abou-Shoer, M. I.; Al-Azizi, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>57</sup> Heyman, H. M.; Meyer, J. J. M. NMR-based metabolomics as a quality control tool for herbal products. *South African Journal of Botany* **2012**, *82*, 21. [CrossRef]
- <sup>58</sup> Lemonakis, N.; Gikas, E.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A.-L. Development and validation of a combined methodology for assessing the total quality control of herbal medicinal products – application to oleuropein preparations. *Plos One* **2013**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>59</sup> Dhami, N.; Mishra, A. D. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? *Journal of Herbal Medicine* **2015**, *5*, 118. [CrossRef]
- <sup>60</sup> Ogegbo, O. L.; Eyob, S.; Parmar, S.; Wanga, Z.-T.; Bligha, S. W. A. Metabolomics of four TCM herbal products: application of HPTLC



analysis. *Analytical Methods* **2012**, *4*, 2522. [[CrossRef](#)]

<sup>61</sup> Santos, M. S.; Pereira-Filho, E. R.; Ferreira, A. G. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR Techniques coupled with chemometric methods. *Química Nova* **2012**, *35*, 2210. [[CrossRef](#)]

<sup>62</sup> Zhi, H.-J.; Qin, X.-M.; Sun, H.-F.; Zhang, L.-Z.; Guoa, X.-Q.; Lia, Z.-Y. Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* L. using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23*, 492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>63</sup> Rasmussen, B.; Cloarec, O.; Tang, H.; Stærk, D.; Jaroszewski, J. W. Multivariate analysis of

integrated and full-resolution 1H-NMR spectral data from complex pharmaceutical preparations: St. John's Wort. *Planta Medica* **2006**, *72*, 556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>64</sup> Farag, M. A.; Wessjohann, L. Metabolome classification of commercial *Hypericum perforatum* (St. John'sWort) preparations via UPLC-qTOF-MS and chemometrics. *Planta Medica* **2012**, *78*, 488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>65</sup> Nováková, L.; Matysová, L.; Solich, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* **2006**, *68*, 908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]