
Rezumatul Tezei de Doctorat

Studiu comparativ al unor extracte naturiste, cu formulări farmaceutice comerciale, cu efect antiagregant plachetar

Doctorand: **Aniela-Cristina Pop (Saplonțai-Pop)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Corina Ionescu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Antiagregante plachetare de sinteză	5
1.1. Agregarea plachetară	5
1.2. Clasificarea antiagregantelor plachetare	6
1.3. Evoluția antiagregantelor plachetare	7
1.4. Monitorizarea activității antiagregantelor plachetare	9
2. Antiagregante plachetare naturale	13
2.1. Familia <i>Alliaceae</i> (<i>Amaryllidaceae</i>)	13
2.1.1. Generalități și scurt istoric	13
2.1.2. <i>Allium cepa</i> - descriere generală	
2.2. Compoziția chimică a <i>Allium cepa</i> , identificarea compușilor-cheie cu utilitate terapeutică	14
2.2.1. Conținutul în flavonoizi al <i>Allium cepa</i>	15
2.2.1.1. Biodisponibilitatea flavonoizilor	15
2.2.1.2. Importanța medicală a flavonoizilor	15
2.2.2. Conținutul în compuși tiosulfinați al <i>Allium cepa</i>	16
2.2.2.1. Biosinteza alkil cistein sulfoxidului (ACSOs)	16
2.2.2.2. Alkyl cistein sulfoxizii și producții lor de degradare	18
2.2.2.3. Aliin alkil-sulfenat-liaza (aliinaza)	19
2.2.2.4. Identificarea compușilor tiosulfinați	20
2.3. Extractele naturiste de <i>Allium</i> și patologia cardiovasculară	21
2.3.1. Efectul antiaterosclerotic al compușilor organosulfurici	21
2.3.2. Inhibarea agregării plachetare	23
2.3.3. Efectul hipocolesterolemiant al compușilor organosulfurici	24
2.3.4. Proprietățile fibrinolitice ale compușilor organosulfurici	24
2.3.5. Alte efecte ale familiei <i>Alliaceaelor</i>	26
2.4. <i>Allium cepa</i> – perspective de viitor	
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
1. Ipoteza de lucru/obiective	29
2. Metodologia generală	
3. Studiul 1 - Determinarea comparativă a efectului antiagregant plachetar și a proprietății antioxidante ale extractelor lichide obținute din șapte soiuri de <i>Allium cepa</i>	31
3.1. Introducere	33
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	34
3.3. Material și metodă	35
3.4. Rezultate	45
3.5. Discuții	59
3.6. Concluzii	61
4. Studiul 2 - Obținerea extractului stabil de <i>Allium cepa</i> și studiul proprietăților cromatografice prin HPLC-MS și GC-MS. Determinarea compușilor tiosulfinați	63
4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	64
4.3. Material și metodă	64

4.4. Rezultate	67
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	75
5. Studiul 3 - Studiul biocompatibilității și testarea citotoxicității formulărilor pe bază de extract de <i>Allium cepa</i>, soiul alb. Testarea efectului antibacterian al formulării cu efectul citotoxic minim	77
5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	78
5.3. Material și metodă	78
5.4. Rezultate	80
5.5. Discuții	85
5.6. Concluzii	86
6. Studiul 4 - Studiu comparativ al unor extracte naturiste cu efect antiagregant plachetar, cu formulări farmaceutice comerciale	89
6.1. Introducere	89
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	89
6.3. Material și metodă	90
6.4. Rezultate	93
6.5. Discuții	100
6.6. Concluzii	101
7. Concluzii generale	103
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

CUVINTE CHEIE: compuși tiosulfinați, compuși organosulfurici, flavonoizi, *Allium cepa*, antiagregant plachetar, agregometrie, antioxidant, HPLC-MS (cromatografie de lichide de înaltă performanță), GC-MS (cromatografie de gaz-spectrometrie de masă), UV-Vis (spectrul de absorbție în ultraviolet-vizibil).

INTRODUCERE

În paralel cu dezvoltarea vertiginoasă a industriei de medicamente și preocuparea continuă pentru optimizarea calității acestora (stabilitate cât mai mare, biodisponibilitate ridicată, scăderea riscului apariției de reacții adverse și interacțiuni medicamentoase), se dezvoltă și industria produselor naturiste.

Deși antiagregantele plachetare de sinteză se situează printre cele mai utilizate medicamente de către specialistul cardiolog, există numeroase studii care atestă un efect similar, exercitat și de extracte obținute din diverse soiuri aparținând familiei *Alliaceae* (*Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium ampeloprasum*); acestea conțin compuși organosulfurici, cu efect de inhibiție a agregării plachetare, formați prin liza S-alk(en)il-L-cistein-sulfoxidului sub acțiunea enzimei specifice, aliinaza.

Mecanismul molecular de acțiune antiagregantă al *Alliaceaelor* este parțial elucidat, asumându-se efectului asupra metabolismului acidului arahidonic, cu impact asupra inhibării formării de tromboxan A₂ și leucotriene, compuși cu efecte vasoconstrictoare și protrombotice.

Studiul bibliografic al tezei abordează problematica complexă a procesului de coagulare sanguină, ținută pe prima etapă a hemostazei, respectiv aderarea și agregarea plachetară, precum și elucidarea mecanismelor moleculare prin care intervin la acest nivel formulările farmaceutice de sinteză și extractele naturiste cu efect antiagregant plachetar.

Scopul principal al acestei cercetări este de a realiza un studiu comparativ al eficacității antiagregante a extractului de *Alliaceae* versus terapia antiagregantă clasică prin studii *in vivo* și *in vitro*. Această temă este de actualitate, având în vedere numărul mare al pacienților care necesită terapie antiagregantă plachetară și incidența ridicată a efectelor adverse ale terapiei clasice.

La ora actuală nu există preocupări de cercetare în țară în domeniul obținerii extractelor de *Allium cepa* cu conținut bogat de compuși tiosulfinați, folosiți pentru efectul antiagregant plachetar.

Menționez că o parte din cercetare am efectuat-o de altfel în cadrul unui proiect național de cercetare (PN-II-PT-PCCA-2013-4-1198), ca parte activă – asistent cercetare. Rezultatele obținute au fost valorificate prin prezentări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale, prin trei lucrări publicate și o lucrare acceptată spre publicare în reviste de specialitate, cotate ISI.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiectivul general al acestei cercetări se va concentra pe obținerea și caracterizarea unui produs farmaceutic pe bază de extract naturist de *Allium cepa* cu proprietăți antiagregante plachetare, care poate fi utilizat în prevenția primară, necesară la pacienții cu risc cardiovascular. Tema abordată își va aduce contribuția într-un domeniu nou la nivel național și de mare actualitate pe plan internațional aflat la frontiera cunoașterii științifice. Cercetările vizează în primul rând **potențialul aplicativ** al unui produs care poate fi utilizat în prevenția primară, absolut necesară la pacienții cu risc cardiovascular.

Cercetarea experimentală a fost realizată cu sprijinul și în cadrul unui program de cercetare național, finanțat printr-un grant de cercetare.

Metodologie generală de studiu

Cercetarea este structurată în 4 studii experimentale. Pentru studiile experimentale și analitice am întocmit un protocol de lucru care a inclus obiectivele, metodologia și rezultatele urmărite.

Fiind parțial demonstrat, în literatură, efectul antiagregant plachetar și efectul antioxidant al extractelor de *Alliaceae*, existând chiar și unele controverse în această direcție, într-o primă etapă a acestei cercetări (studiul 1) s-a urmărit confirmarea acestor proprietăți prin studii *in vitro*, și identificarea prin teste comparative a soiului de *Allium cepa* cu efectul antiagregant cel mai ridicat. Concomitent s-a identificat compoziția extractelor obținute și s-a stabilit o corelație între tipurile de compuși identificate și proprietățile extractelor. În studiul 2 s-au obținut formulări solide, stabile, pe

bază de extract din soiul alb de *Allium cepa* și s-a identificat compoziția/conținutul în compuși tiosulfinați prin utilizarea de metode cromatografice.

Ținând cont de necesitatea utilizării formulării pe bază de extract de *Allium* pentru studiile *in vivo*, s-a considerat apoi absolut necesară efectuarea studiului 3. În prima parte a studiului 3 s-a testat prin metode *in vitro* efectul formulărilor obținute asupra viabilității celulare, pentru a identifica formularea cu efectul citotoxic minim. În a doua parte a studiului 3, ca o cercetare conexasă, s-au identificat proprietățile antimicrobiene ale extractelor prin testarea efectului de inhibiție a dezvoltării culturilor bacteriene.

În urma rezultatelor obținute la studiile anterior enumerate, a fost identificată formularea pe bază de extract de *Allium cepa* obținută din soiul cu efectul antiagregant maxim și cantitatea cea mai ridicată de compuși tiosulfinați, stabilă, cu efectul citotoxic minim. Aceasta reprezintă formularea testată ulterior în studiul 4.

Studiul 4 este un studiu clinic, prospectiv, prin care s-a urmărit cuantificarea efectului antiagregant plachetar al formulării pe bază de extract de *Allium cepa*; studiul a fost unul comparativ, care a vizat comparația efectului antiagregant plachetar cu agentul antiplachetar de sinteză corespunzător (cu același mecanism de acțiune).

STUDIUL 1. Determinarea comparativă a efectului antiagregant plachetar și a proprietății antioxidante ale extractelor lichide obținute din șapte soiuri de *Allium cepa*

Obiectivele acestui studiu sunt:

- identificarea comparativă a compoziției extractelor lichide obținute din șapte soiuri de *Allium cepa*: conținutul și tipurile de flavonoizi și compuși tiosulfinați;
- stabilirea proprietăților antioxidante ale extractelor;
- identificarea prin studii *in vitro* a efectului antiagregant plachetar al extractelor;
- studiu comparativ și stabilirea unei conexiuni între compoziția extractelor și proprietățile antioxidante și antiagregante plachetare ale acestora.

Material și metodă

S-au obținut extractele apoase și etanolice din șapte soiuri de *Allium cepa*, conform fluxului tehnologic menționat în detaliu în teza *in extenso*. Testarea conținutului de compuși antioxidanți s-a efectuat pe baza proprietăților spectrofotometrice și cromatografice ale extractelor (utilizând spectrofotometrul **Varian, Cary 50** și sistemul **Agilent 1200 HPLC**, complet echipat), iar conținutul de compuși tiosulfinați s-a determinat pe baza consumului în reacția acestora cu 4-mercapto-piridina (4-MP). Testarea capacității antioxidante s-a determinat prin trei metode distincte (metoda Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC), iar efectul antiagregant a fost cuantificat *in vitro* pe baza răspunsului spectrofotometric diferit în funcție de agregabilitatea probei (utilizând două metode de calcul, notate M1 și M2). Cercetarea experimentală s-a efectuat la Institutul de Chimie "Raluca Rîpan" și în Laboratorul Departamentului de Biochimie al UBB Cluj-Napoca.

Rezultate și discuții

Au fost identificați compușii flavonoizi din compoziția extractelor testate. Extractul apos are un conținut mai mare de compuși tiosulfinați decât cel etanolic. Extractul apos de *Allium cepa* are și alți compuși antioxidanți care nu se văd în spectru la 360nm și care pot fi compuși cu sulf.

Unele dintre metodele utilizate (de ex. metoda Folin-Ciocalteu) sunt metode de cuantificare a fenolilor/polifenolilor, aceștia fiind considerați a avea efect antioxidant. Menționăm că extractul este unul cu conținut multiplu, deci efectul antioxidant total poate fi influențat și de alte clase de compuși, nu doar de clasa fenolilor.

Activitatea antiagregantă plachetară diferă parțial prin cele două metode M1 și M2, deoarece una se bazează pe calcularea inhibiției maxime a agregării plachetare, iar cealaltă pe viteza cu care are loc reacția de inhibare a agregării plachetare.

Extractul din soiul alb de *Allium cepa*, are cel mai puternic efect antiagregant plachetar și un efect antioxidant aproape inexistent, iar soiurile de *Allium cepa* roșie au cea mai puternică activitate antioxidantă, prin toate cele trei metode de determinare folosite (FC, TEAC, DPPH), și cel mai mic efect de inhibare a agregării plachetare față de celelalte soiuri.

Studiul nostru demonstrează o corelație negativă între activitatea antiagregantă plachetară și capacitatea antioxidantă a extractelor de *Allium cepa*; aceasta este foarte importantă pentru domeniul de calitate al alimentelor, implicând alegerea modului de procesare a acestora.

Analiza componentelor principale (PCA) conferă informații importante referitoare la stabilirea corelației între activitatea antioxidantă, antiagregantă plachetară și alți parametri care descriu calitatea extractelor de *Allium cepa*.

Există un coeficient de corelație ridicat între pH-ul extractului și proprietatea antioxidantă, între acestea fiind o relație de proporționalitate indirectă; deasemenea se constată o corelație puternică între pH și efectul antiagregant plachetar determinat prin metoda M1, într-o relație direct proporțională.

Observăm că nu există o corelare perfectă între cantitatea totală de compuși tiosulfinați, determinați prin reacția cu 4-MP și efectul antiagregant plachetar determinat prin metoda M1, motiv pentru care presupunem că numai anumiți compuși tiosulfinați favorizează inhibarea agregării plachetare sau că aceasta se datorează și altor compuși prezenți, ținând cont de conținutul multiplu al extractelor.

Concluzii

Extractul apos de *Allium cepa* are un conținut mai mare de compuși tiosulfinați decât cel etanolic.

Activitatea antiagregantă plachetară a extractelor de *Allium cepa* depinde direct proporțional de doza de extract utilizată.

Ca o noutate cercetările întreprinse au demonstrat corelația strânsă observată între pH-ul extractului și cele două tipuri de activitate (antioxidantă, respectiv antiagregantă plachetară).

S-a evidențiat o grupare clară a *Allium cepa*, în funcție de tip și soi, pe baza pH-ului, parametrilor antiagreganți plachetari și antioxidanți. Extractul din soiul alb de *Allium cepa*, are cel mai puternic efect antiagregant plachetar și un efect antioxidant aproape inexistent, iar soiurile de *Allium cepa* roșie au cea mai puternică activitate antioxidantă

STUDIUL 2. Obținerea extractului stabil de *Allium cepa* și studiul proprietăților cromatografice prin HPLC-MS și GC-MS. Determinarea compușilor tiosulfinați

Obiectivele acestui studiu sunt:

- obținerea unor formulări solide/lioofilizate pe bază de extract de *Allium cepa*, stabile în mediul extern (stabilizarea extractului cu diverși excipienți);
- identificarea compușilor tiosulfinați prin analiza proprietăților spectrale HPLC-MS și GC-MS pentru toate cele cinci formulări și extractul lichid.

Material și metodă

S-a utilizat extractul liofilizat de *Allium cepa* - soiul alb (obținut cu ajutorul liofilizatorului **Lyophilizer – Model Alpha 1-4LDPLUS**), stabilizat cu excipienți, în proporțiile menționate: carboximetilceluloză, dioxid de siliciu, stearat de zinc, stearat de magneziu și gelatină.

Compoziția extractelor, conținutul în compuși tiosulfinați, s-a determinat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC-MS) și gaz-cromatografie - cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). Pentru analizele HPLC-MS s-a utilizat un Cromatograf de lichide de înaltă performanță (**HPLC**) **Agilent 1200/2008** cu detectori: VWD-G1314B și MS, iar pentru analizele GC-MS s-a utilizat un **Gaz-cromatograf GC-MS Agilent - 7890A/5975/008**.

Rezultate și discuții

S-au obținut 5 probe diferite pe bază de extract de *Allium cepa* – soiul alb, în funcție de excipienții utilizați și concentrațiile acestora, care și-au păstrat proprietatea de anhidricitate și stabilitate în mediul extern.

Prin tehnica HPLC, s-a identificat în compoziția probelor de analizat (formulare - extract stabilizat cu excipienți), prezența a 5 compuși tiosulfinați: C1=MeS(O)S1-propenil (*E,Z*) ($m/z=137$), C2=MeSS(O)1-propenil-(*E*) ($m/z=137$ și 45), C3= MeS(O)SMe $m/z=111$), C4=n-PrS(O)S1-propenil-(*E*) și C5=n-PrS(O)CH₂EtSS1-propenil.

Rezultatele HPLC-MS ale probelor luate în lucru arată prezența compușilor tiosulfinați în probele liofilizate - extractele de *Allium cepa* și în extractele apoase lichide luate în studiu (extract de *Allium cepa* proaspăt și extract de *Allium cepa* ținut în congelator). La analiza prin GC-MS se identifică suplimentar încă doi compuși, nerelevați în probele liofilizate.

Spectrele de masă ale tuturor compușilor tiosulfinați prezenți în extractul de *Allium cepa* alb sunt identificate între spectrele de masă din biblioteca de spectre NIST.

Concluzii

S-a identificat în compoziția probelor de analizat (formulare - extract stabilizat cu excipienți), prin HPLC-MS, prezența a 5 compuși tiosulfinați, iar la analiza prin GC-MS se identifică suplimentar încă doi compuși, nerelevați în probele liofilizate.

Compușii tiosulfinați identificați în probele pe bază de extract de *Allium cepa* - soiul alb, luate în studiu sunt în concordanță cu datele din literatură.

STUDIUL 3. Studiul biocompatibilității și testarea citotoxicității formulărilor pe bază de extract de *Allium cepa*, soiul alb. Testarea efectului antibacterian al formulării cu efectul citotoxic minim

Obiectivele acestui studiu sunt:

- evaluarea *in vitro*, pe culturi de celule endoteliale umane - HUVEC - a citotoxicității generate de expunerea la mai multe formulări pe bază de extracte liofilizate de ceapă;
- identificarea formulării cu efectul minim/absent asupra viabilității celulare care să fie utilizat în continuare, în următorul capitol al cercetării;
- cuantificarea efectului antibacterian al extractului lichid de *Allium cepa* și al celui liofilizat stabilizat cu excipienți, asupra celor două clase de bacterii Gram pozitive și Gram negative, prin reprezentanții lor.

Material și metodă

Al treilea studiu, de testare a efectului citotoxic al formulărilor sintetizate, s-a efectuat la Laboratorul de studii *in vitro*, al Catedrei de Fiziologie, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Evaluarea a fost efectuată pe celule endoteliale umane din vena ombilicală (**HUVEC, Promocell**, Hamburg, Germania). Celulele au fost cultivate în mediu RPMI completat cu 5% ser fetal de vițel, 50 μg/ml de gentamicină și amfotericină 5 ng/ml (**Biochrom Ag**, Berlin, Germania). Viabilitatea a fost măsurată imediat prin măsurarea colorimetrică a unui compus colorat - formazan, generat de celulele viabile folosind **CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay** (Promega Corporation, Madison, SUA). Citotoxicitatea s-a evaluat ca OD₄₉₀ sau OD₅₇₀.

Partea de testare a efectului antimicrobian al extractelor s-a realizat în Laboratorul de Microbiologie al Facultății de Biologie și Geologie, UBB Cluj-Napoca, iar culturile pentru tulpinile bacteriene standard au fost procurate de la Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, Cluj-Napoca.

S-au realizat trei tipuri de experimente: a. Metoda rondelilor îmbibate cu extract lichid de *Allium cepa*; b. Metoda godeurilor în mediul de cultură umplute cu extract lichid de *Allium cepa*; c. Metoda godeurilor în mediul de cultură umplute cu formularea liofilizată pe bază de extract de ceapă încorporată în apă ultrapură). Pentru fiecare metodă utilizată testarea s-a realizat în triplicat.

Rezultate și discuții

Extractul de *Allium* stabilizat cu excipienții - dioxid de siliciu, stearat de zinc și gelatină, s-a demonstrat a avea efectul citotoxic cel mai redus la toate concentrațiile, încă de la diluții de 2:1, cu menținerea unei viabilități celulare ridicate. Următoarea din punct de vedere al efectului scăzut asupra viabilității celulare este extractul de *Allium* cu excipienți - dioxid de siliciu, stearat de magneziu.

Astfel dintre formulările testate în acest studiu, cea care a demonstrat efectul citotoxic minim la concentrația maximă este un candidat excelent pentru utilizarea sa în concentrații non-toxice pentru proprietățile sale antiagregante plachetare.

Eficacitate antibacteriană importantă a fost demonstrată atât în cazul extractului lichid, cât și în privința extractului liofilizat, stabilizat, prin metoda godeurilor din mediul de cultură umplute cu extract de *Allium cepa*, respectiv formularea liofilizată pe bază de extract de ceapă încorporată în apă ultrapură.

Inhibiția cea mai importantă și eficacitate antimicrobiană mai ridicată a fost observată asupra bacteriilor Gram pozitive, de tipul *Staphylococcus aureus*.

Concluzii

Formularea de *Allium cepa*, stabilizată cu excipienții - dioxid de siliciu, stearat de zinc și gelatină a fost foarte bine tolerată de celulele endoteliale, prin studii *in vitro* și s-a demonstrat a avea efectul citotoxic cel mai redus.

În urma testării efectelor antimicrobiene ale extractelor de *Allium cepa* prin cele trei metode putem afirma că acestea prezintă activitate antimicrobiană. Eficacitatea antimicrobiană cea mai ridicată a fost observată asupra bacteriilor Gram pozitive de tipul *Staphylococcus aureus*.

STUDIUL 4. Studiu comparativ al unor extracte naturiste cu efect antiagregant plachetar, cu formulări farmaceutice comerciale

Obiectivele acestui studiu sunt:

- evaluarea efectului antiagregant plachetar al formulării obținute, stabile, pe bază de extract de *Allium cepa*;
- testarea *in vivo* a activității antiagregante plachetare a extractului de *Allium* comparativ cu formulări farmaceutice comerciale. Se alege preparatul farmaceutic de sinteză (aspirina) care acționează prin același mecanism, de inhibare a metabolismului acidului arahidonic, ca și extractul de *Allium cepa*.

Material și metodă

S-a efectuat un studiu clinic prospectiv, *in vivo*, pentru demonstrarea efectului antiagregant plachetar comparativ cu un antiplachetar de sinteză; au fost incluși în studiu 25 pacienți sănătoși, cu vârste cuprinse între 20-60 ani, fără medicație la domiciliu și fără patologii asociate; pacienții au fost împărțiți în trei loturi (primul lot a primit aspirină, al doilea lot a primit formularea pe bază de extract de *Allium cepa* și al treilea lot a primit preparat placebo). Pentru aceasta s-a întocmit un protocol de studiu; studiul clinic a fost avizat de către Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Participarea pacienților la studiu a fost benevolă, și-au exprimat consimțământul în cunoștință de cauză, având posibilitatea de a se retrage din studiu în orice moment. Au fost respectate normele de etică în cercetarea clinică și securitatea informațiilor cu caracter personal.

Formularea pe bază de extract de *Allium* de testat, a fost obținută și încapsulată în cadrul Laboratorului Institutului de Chimie "Raluca Rîpan", iar testarea efectului antiagregant plachetar s-a realizat în cadrul Laboratorului de la Institutul Inimii "Niculae Stăncioiu" Cluj-Napoca, cu ajutorul agregometrului **Multiplate analyzer**. S-au efectuat determinări biologice (testarea agregării plachetare) la începutul studiului și la finalizarea lui, în ziua 10.

Rezultate și discuții

Este evident efectul antiagregant plachetar al aspirinei prin modificarea adecvată a celor trei parametri urmăriți, cuantificați și înregistrați automat de softul aparatului Multiplate analyzer.

Aria de sub curbă (AUC) inițială medie a celor zece pacienți din primul lot, considerat lot control, a fost de 71.3 ± 21.34 și s-a observat o scădere până la 13.1 ± 8.33 posttratament, scădere semnificativă statistic cu $p < 0.0001$, după cum era de așteptat. Același rezultat a fost obținut și pentru ceilalți doi parametri: agregarea plachetară totală și viteza (panta maximă a curbei de agregare).

AUC scade semnificativ statistic și în cazul pacienților tratați cu formularea naturistă pe bază de extract de *Allium*, de la o medie de 64.1 ± 14.7 pretratament la 29 ± 9.3 posttratament, cu o scădere semnificativă și în cazul parametrilor de agregare plachetară totală și viteză. Acest rezultat susține efectul antiagregant plachetar al formulării-extractului testat, cu diferență semnificativă statistic posttratament.

Diferența între media parametrului AUC posttratament, comparativ la lotul de control pozitiv cu lotul test se observă o diferență semnificativă statistic, cu $p = 0.0011$, utilizând ca și test statistic testul t pentru variabile independente. Identic și în cazul parametrului de agregare totală, se identifică un $p = 0.0028$, cu semnificație statistică între lotul control și lotul test. Referitor la ultimul parametru, al vitezei sau pantei maxime (AU/minut), nu există diferență semnificativă statistic a agregării plachetare posttratament la lotul test față de lotul control-pozitiv, cu $p = 0.066$, practic viteza de inhibare a agregării plachetare nu diferă semnificativ.

Ținând cont de diferența semnificativă între răspunsurile obținute posttratament la cele două loturi, control și test, corelat cu diferența semnificativă intralot (la pacienții din grupul test), se poate ridica problema unei doze de extract posibil prea mici pentru a atinge nivelul efectului antiagregant al aspirinei. În acest context, se poate lua în considerare ca un orizont de continuare a cercetării actuale, încercarea de obținere a unor formulări care să conțină o cantitate mai mare de substanță activă/compuși tiosulfinați, posibil prin obținerea de comprimate pe bază de extract de *Allium cepa*.

Concluzii

Formularea farmaceutică de sinteză utilizată ca și control pozitiv a scăzut semnificativ agregarea plachetară, prin toți cei trei parametri înregistrați automat la testarea agregării plachetare; toți pacienții incluși în acest lot au prezentat un răspuns adecvat la terapia cu aspirină.

Formularea de testat, administrată la pacienții din lotul test, a prezentat deasemenea o scădere semnificativă statistic a agregării plachetare posttratament.

Diferențele între efectul antiagregant plachetar al aspirinei și al formulării naturiste testate sunt semnificative statistic, în cazul primilor doi și celor mai importanți parametri studiați (AUC și agregarea totală), ceea ce denotă că extractul testat, la doza administrată în acest studiu nu se ridică la nivelul aspirinei ca eficiență a antiagregării plachetare.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

La ora actuală nu există preocupări de cercetare, pe plan național, în domeniul obținerii extractelor pe bază de *Allium cepa* bogate în compuși tiosulfinați, folosite pentru efectul antiagregant plachetar. Prezentul proiect vizează obținerea și caracterizarea unui extract naturist cu proprietăți antiagregante plachetare, cu un preț de cost scăzut. Acesta este relevant, raportat la numărul mare de pacienți cu patologie cardiovasculară și necesitatea aproape obligatorie a prevenției primare.

O altă utilitate este lărgirea seriei produselor naturiste cu proprietăți antiagregante care ar putea fi comercializate, prin standardizarea obținerii extractului de *Allium cepa* și stabilizarea acestuia cu diverși excipienți. Acest fapt poate conduce la consolidarea industriei românești de produse naturiste utilizate în prevenția patologiei cardiovasculare.

În premieră, o parte din cercetarea cuprinsă în această teză demonstrează prin utilizarea de studii *in vivo*, efectul antiagregant plachetar a unui produs naturist pe bază de extract de *Allium cepa*.

În cadrul unui singur studiu sunt identificate majoritatea proprietăților extractului lichid și liofilizat de *Allium cepa* prezentate în literatura de specialitate (antioxidant, citotoxic, antimicrobian, antiagregant plachetar), acesta din urmă fiind subiectul central al cercetării.

PhD Thesis - Abstract

Comparative study of natural extracts with antiplatelet effect, with pharmaceutical commercial formulations

PhD Student: **Aniela-Cristina Pop (Saplontai-Pop)**

Scientific Supervisor: **Prof. Corina Ionescu, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
REVIEW OF THE LITERATURE	3
1. Synthesis antiplatelet agents	5
1.1. Platelet aggregation	5
1.2. Classification of antiplatelet agents	6
1.3. Antiplatelet agents evolution	7
1.4. Monitoring the activity of antiplatelet agents	9
2. Natural antiplatelet agents	13
2.1. <i>Alliaceae</i> family (<i>Amaryllidaceae</i>)	13
2.1.1. Generalities and short history	13
2.1.2. <i>Allium cepa</i> - general description	
2.2. Chemical composition of <i>Allium cepa</i> , identification of key-compounds with therapeutic utility	14
2.2.1. Flavonoids content of <i>Allium cepa</i>	15
2.2.1.1. Flavonoids bioavailability	15
2.2.1.2. Medical importance of flavonoids	15
2.2.2. The <i>Allium cepa</i> thiosulfinates compounds content	16
2.2.2.1. Biosynthesis of alkyl cysteine sulfoxide (ACSOs)	16
2.2.2.2. Alkyl cistein sulfoxides and their degradation products	18
2.2.2.3. Alliin alkyl-sulfonate-lyase (aliinase)	19
2.2.2.4. Identification of thiosulfinates compounds	20
2.3. Natural extracts of <i>Allium</i> and cardiovascular pathology	21
2.3.1. Antiatherosclerotic effect of organosulfur compounds	21
2.3.2. Platelet aggregation inhibition	23
2.3.3. Cholesterol lowering effect of organosulfur compounds	24
2.3.4. Fibrinolytic properties of organosulfur compounds	24
2.3.5. Other effects of <i>Alliaceae</i> family	26
2.4. <i>Allium cepa</i> – future perspectives	
PERSONAL CONTRIBUTIONS	27
1. Working hypothesis/objectives	29
2. General methodology	31
3. Study 1 - Comparative study of the antiplatelet effect and antioxidant properties of the liquid extracts obtained from seven varieties of <i>Allium cepa</i>	33
3.1. Introduction	33
3.2. Work hypothesis/objectives	34
3.3. Material and methods	35
3.4. Results	45
3.5. Discussions	59
3.6. Conclusions	61
4. Study 2 - Obtaining stable <i>Allium cepa</i> extract and studying chromatographic properties using HPLC-MS and GC-MS. Thiosulfinates compounds determination	63
4.1. Introduction	63
4.2. Work hypothesis/objectives	64
4.3. Material and methods	64

4.4. Results	67
4.5. Discussions	74
4.6. Conclusions	75
5. Study 3 - Biocompatibility and cytotoxicity study of the formulations based on <i>Allium cepa</i> extract-white variety . Testing the antibacterial effect of the formulation with the minimum cytotoxic effect	77
5.1. Introduction	77
5.2. Work hypothesis/objectives	78
5.3. Material and methods	78
5.4. Results	80
5.5. Discussions	85
5.6. Conclusions	86
6. Study 4 - Comparative study of natural extracts with antiplatelet effect, with pharmaceutical commercial formulations	89
6.1. Introduction	89
6.2. Work hypothesis/objectives	89
6.3. Material and methods	90
6.4. Results	93
6.5. Discussions	100
6.6. Conclusions	101
7. General conclusions	103
8. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107

KEYWORDS: thiosulfinates compounds, organosulfur compounds, flavonoides, *Allium cepa*, antiplatelet, aggregometry, antioxidant, HPLC-MS (high performance liquid chromatography), GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry), UV-Vis (ultraviolet-visible absorption spectra).

INTRODUCTION

In the same time with fast development of drug industry and continuing concern to optimize their quality (greater stability, higher bioavailability, decreased risks of side effects and drug interactions), develops the natural products industry too.

Although the synthesis antiplatelet agents is among the most widely used medications by the cardiologist, there are many studies that show a similar effect exercised by the extracts obtained from different varieties of *Alliaceae* family (*Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium ampeloprasum*); these contains organosulfur compounds, with platelet aggregation inhibition effect, formed from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide by the action of a specific enzyme - aliinase.

The molecular mechanism of antiplatelet effect of *Alliaceae* family is partially elucidated, being explained by the effect on the arachidonic acid metabolism, with impact on inhibiting the formation of thromboxane A₂ and leukotrienes, known as compounds with vasoconstrictor and prothrombotic effects.

The literature study of the thesis approaches the complex problem of blood coagulation process, targeted on the first stage of hemostasis, respectively platelet adhesion and aggregation, as well as elucidation of the molecular mechanisms through which intervened at this level the pharmaceutical synthesis formulations and the natural extracts with antiplatelet effect.

The main purpose of this research is to conduct a comparative study of the antiplatelet efficacy of *Alliaceae* extract versus classical antiplatelet therapy, using *in vivo* and *in vitro* studies. This theme is topical considering the large number of patients requiring antiplatelet therapy and the high incidence of adverse effects of conventional therapy.

Currently there are no concerns research in our country in the field of *Allium cepa* extracts, with high content of thiosulfinates compounds, used for antiplatelet effect.

I conducted part of this research within a national research project (PN-II-PT-PCCA-2013-4-1198), as an active member - research assistant. The results obtained were valorized as presentations at national and international scientific manifestations, three scientific papers published and one accepted for publication in specialized journals, ISI indexed.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The **general objective** of this research is focused on obtaining and characterization of a pharmaceutical product based on natural extract of *Allium cepa* with antiplatelet properties, that can be used in primary prevention, necessary for patients with cardiovascular risk.

The theme approached will contribute to a new nationally field and highly topical internationally, being at the border of scientific knowledge. Researches aimed primarily the potential applications of a product that can be used in primary prevention, absolutely necessary in patients with cardiovascular risk.

General methodology

The research is divided in four experimental studies. For experimental and analytical studies it was drafted a working protocol that included objectives, methodology and expected results.

Being partially demonstrated in the literature, antiplatelet and antioxidant effect of the *Allium* extract, existing even some controversy in this direction, in the first stage of the research (**Study 1**) the objective was to confirm these properties using *in vitro* tests, and identification of the variety of *Allium cepa* with the highest antiplatelet effect.

Simultaneously it was identified the composition of the extract obtained and it has been established a correlation between the identified compounds and extracts properties. In **study 2**, there were obtained solid, stable formulations, based on *Allium cepa* extract - white variety of and it was identified the composition/contents of thiosulfinates compounds, using chromatographic methods.

Given the necessity to use formulation based on *Allium* extract for *in vivo* studies, it was considered absolutely necessary conducting the **study 3**. In the first part of the study 3 it was tested the effects of the obtained formulations on cell viability, using *in vitro* methods, in order to identify the formulation with the minimum cytotoxic effect. In the second part of the study 3, as a related research, there were identified antimicrobial properties of the extracts, by testing inhibition of bacterial cultures development.

Following the results obtained in previous mentioned studies, it was identified the *Allium cepa* extract based formulation obtained from the variety with maximum antiplatelet effect and the highest amount of thiosulfinates compounds, stable, with minimal cytotoxic effect. This is the formulation tested subsequently in the study 4.

Study 4 is a clinical, prospective trial; it was quantified the antiplatelet effect of the formulation based on *Allium cepa* extract. The trial was a comparative study, which aimed the comparison of antiplatelet effect with the corresponding synthesis antiplatelet agent (with the same action mechanism).

STUDY 1. Comparative study of the antiplatelet effect and antioxidant properties of the liquid extracts obtained from seven varieties of *Allium cepa*

Objectives of this study are:

- comparative identification of the composition of liquid extracts obtained from seven varieties of *Allium cepa*: the content and types of flavonoids and thiosulfinates compounds;
- determination of antioxidant properties of the extracts;
- determination of antiplatelet effect of the extracts, using *in vitro* tests;
- comparative study and establishing a connection between the extracts composition and their antioxidant and antiplatelet properties.

Material and methods

There were obtained the aqueous and ethanolic extracts from seven varieties of *Allium cepa*, as referred in the technological flow, mentioned in the *in extenso* thesis.

Identification of the antioxidant compounds was based on spectrophotometric and chromatographic properties of the extracts (using spectrophotometer **Varian, Cary 50** and **Agilent 1200 HPLC system**, fully equipped); thiosulfinates compounds content was determined based on their consumption in reaction with 4-mercapto pyridine (4-MP).

Testing antioxidant capacity was determined by three different methods (Folin-Ciocalteu method, DPPH, TEAC), and the antiplatelet effect was quantified *in vitro*, based on different spectrophotometric response depending on sample aggregability (using two methods of calculation, noted M_1 and M_2).

The experimental research was conducted at the Institute of Chemistry "Raluca Ripan" and the Laboratory of Biochemistry Department, UBB Cluj-Napoca.

Results and discussions

There were identified the flavonoid compounds in the composition of the tested extracts. The aqueous extract has a higher content of thiosulfinates compounds than ethanolic one. The aqueous extract of *Allium cepa* has other antioxidant compounds too, that are not seen in the spectrum at 360 nm, which can be sulfur compounds.

Antiplatelet aggregation activity differ in part through the M_1 and M_2 methods, because one is based on the calculation of the maximum inhibition of platelet aggregation and the other on the speed of the platelet aggregation inhibition reaction.

The extract from white variety of *Allium cepa* has the most powerful antiplatelet effect and an antioxidant effect almost nonexistent, and red varieties of *Allium cepa* have the strongest antioxidant

activity by all three assay methods used (FC, TEAC, DPPH) and the lowest inhibitory effect on platelet aggregation compared to other varieties.

Our study demonstrates a negative correlation between antioxidant capacity and antiplatelet activity of the *Allium cepa* extracts; it is very important for the quality of food, involving the choice used for processing them.

Principal Components Analysis (PCA) gives important information on establishing the correlation between antioxidant activity, antiplatelet and other parameters describing the quality of *Allium cepa* extracts.

There is a high correlation coefficient between the pH of the extract and antioxidant property, with an indirect proportionality relationship; also there is a strong correlation between pH and antiplatelet effect determined by the M1 method in a direct proportional relation.

We note that there is a perfect correlation between the total thiosulfinates content, determined by the reaction with 4-MP and antiplatelet effect determined by the M1 method, which is why we assume that only certain thiosulfinates compounds promotes inhibition of platelet aggregation.

Conclusions

Allium cepa aqueous extract has a higher content of thiosulfinates compounds than ethanolic one. Antiplatelet activity of *Allium cepa* extracts depends direct proportionally to the dose of the extract used.

As a novelty, the researches undertaken have demonstrated the strong relationship observed between the pH of the extract and the two types of activity (antioxidant, respectively antiplatelet).

It was highlighted a grouping of *Allium cepa*, depending on the type and variety, based on pH, antiplatelet and antioxidant parameters. Extract of *Allium cepa* - white variety, has the most powerful antiplatelet effect and an antioxidant effect almost nonexistent, and red varieties of *Allium cepa* have the strongest antioxidant activity

STUDY 2. Obtaining stable *Allium cepa* extract and studying chromatographic properties using HPLC-MS and GC-MS. Thiosulfinates compounds determination

Objectives of this study are:

- obtaining solid formulations/lyophilized extract based on *Allium cepa* extract, stable in the external environment (stabilization of the extract with various excipients);
- identification of thiosulfinates compounds by analyzing the spectral properties HPLC-MS and GC-MS for all five formulations and the liquid extract.

Material and methods

It was used lyophilized extract of *Allium cepa* - white variety (obtained using Lyophilizer - **Model Alpha 1-4LDPLUS**), stabilized by excipients, in the proportions mentioned: carboxymethyl cellulose, silicon dioxide, zinc stearate, magnesium stearate and gelatin.

The extracts composition, thiosulfinates compounds content, it was determined by high performance liquid chromatography (HPLC-MS) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). For HPLC-MS analyzes it was used a high performance liquid Chromatograph (HPLC) with **Agilent 1200/2008** detectors: VWD-G1314B and MS, and for GC-MS analyzes it was used a Gas chromatograph **GC-MS Agilent - 7890A/5975/008**.

Results and discussions

There were obtained five different samples based on *Allium cepa* extract - white variety, depending on the excipients used and their concentrations, which have retained the property of anhydricity and stability in the external environment.

Using HPLC, it was identified in the composition of the analyzed samples (formulation - stabilized extract), the presence of 5 thiosulfinates compounds: C1=MeS(O)S1-propenyl (*E,Z*) ($m/z=137$),

C2=MeSS(O)1-propenyl-(E) (m/z=137 și 45), C3=MeS(O)SMe m/z=111), C4=n-PrS(O)S1-propenyl-(E) și C5=n-PrS(O)CH₂SS1-propenyl.

HPLC-MS results shows the presence of thiosulfinates constituents in the lyophilized samples - *Allium cepa* extracts and in the liquid aqueous extracts studied (fresh *Allium cepa* extract and freeze-dried *Allium cepa* extract). Using GC-MS analysis there were additionally identified two compounds, that were not presents in lyophilized samples.

Mass spectra of all thiosulfinates compounds presents in the *Allium cepa* extract - white variety are identified among the mass spectra from the NIST spectra library.

Conclusions

Using HPLC method there were identified in the composition of the analyzed samples (formulation - extract stabilized with excipients), the presence of 5 thiosulfinates compounds, and using GC-MS analysis there were identified another two compounds unidentified in the lyophilized samples.

Thiosulfinates compounds identified in studied samples based on *Allium cepa* extract - white variety, are in accordance with literature data.

STUDY 3. Biocompatibility and cytotoxicity study of the formulations based on *Allium cepa* extract-white variety. Testing the antibacterial effect of the formulation with the minimum cytotoxic effect

Objectives of this study are:

- *in vitro* cytotoxicity evaluation, using human umbilical vein endothelial cells - HUVEC - resulting from exposure to several lyophilized formulations based on *Allium cepa* extracts;
- identification of the formulation with minimal/absent effect on cell viability, to be used further in the next chapter of this research;
- quantification of the antibacterial effect of the liquid and lyophilized, stabilized *Allium cepa* extract, on the two classes of bacteria: Gram positive and Gram negative, through their representatives.

Material and methods

The third stage, of testing the cytotoxic effect of synthesized formulations, was conducted at the Laboratory of *in vitro* studies, from the Physiology Department of "Iuliu Hațieganu" UMF, Cluj-Napoca.

The evaluation was performed on human umbilical vein endothelial cells (**HUVEC, Promocell**, Hamburg, Germany). The cells were cultivated in RPMI medium supplemented with 5% fetal calf serum, 50 µg/ml gentamicin and 5 ng/ml amphotericin (**Biochrom Ag**, Berlin, Germany).

Viability was measured immediately by colorimetric measurement of a colored compound - formazan, generated by viable cells using **CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay** (Promega Corporation, Madison, USA). Cytotoxicity was measured as OD490 and OD570.

Part of testing the antimicrobial effect of extracts was performed in Microbiology Laboratory of the Faculty of Biology and Geology, UBB Cluj-Napoca, and cultures for standard bacterial strains were purchased from the Institute for Interdisciplinary Research in Bio-Nano-Sciences, Cluj-Napoca.

There were performed three types of experiments: a. Method of disks soaked with liquid extract of *Allium cepa*; b. Method of wells in the culture medium filled with liquid extract of *Allium cepa*; c. Method of wells in the culture medium filled with lyophilized formulation based on onion extract transformed by the incorporation of ultrapure water. Each test method used was performed in triplicate.

Results and discussions

The *Allium* extract stabilized with excipients - silicon dioxide, zinc stearate and gelatin, have been shown to have the lowest cytotoxic effect at all concentrations, from dilutions of 2:1, maintaining a

high cell viability. Next, in terms of decreased effect on cell viability, is the *Allium* extract stabilized with silicon dioxide, magnesium stearate.

Thus the formulations tested in this study, which demonstrated the minimal cytotoxic effect at maximum concentration is an excellent candidate for use in non-toxic concentrations for its antiplatelet properties.

Significant antibacterial efficacy has been demonstrated in both cases of liquid and lyophilized, stabilized extract, using the method of wells in the culture medium filled with *Allium cepa* extract or lyophilized formulation based on *Allium* extract incorporated with ultrapure water.

The most important inhibition and higher antimicrobial efficacy was observed on the Gram-positive bacteria, the type of *Staphylococcus aureus*.

Conclusions

Allium cepa formulation, stabilized with excipients - silicon dioxide, zinc stearate and gelatin, was very well tolerated by the endothelial cells, using *in vitro* studies and have been shown to have the lowest cytotoxic effect.

After testing antimicrobial effects of *Allium cepa* extracts using the three mentioned methods, we can say that these presents antimicrobial activity. The highest antimicrobial efficacy it was observed on the Gram-positive bacteria, of the type of *Staphylococcus aureus*.

STUDY 4. Comparative study of natural extracts with antiplatelet effect, with pharmaceutical commercial formulations

Objectives of this study are:

- assessing the antiplatelet effect of the stable formulation obtained, based on *Allium cepa* extract;
 - *in vivo* testing of antiplatelet activity of the *Allium* extract, compared to the commercial formulation.
- It was choosed a synthetic pharmaceutical formulation which acts via the same mechanism of inhibition of the arachidonic acid metabolism as *Allium cepa* extract (aspirin).

Material and methods

It was conducted a prospective, *in vivo*, clinical study, to demonstrate the antiplatelet effect compared with a synthesis antiplatelet agent; were included in the study 25 healthy volunteers, aged between 20-60 years, without medication and without associated pathologies; patients were divided into three groups (first group received aspirin, the second group received extract based on *Allium cepa* formulation and the third group received placebo).

For this, it was prepared a study protocol; the clinical study was advised by the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" UMF, Cluj-Napoca. Patients participation in the study was voluntary, they have expressed their consent to knowingly, having the opportunity to withdraw from the study at any time. There have been respected the clinical research ethics rules and security of personal information.

Tested formulation based on *Allium* extract was obtained and encapsulated in the Laboratory of "Raluca Rîpan" Institute of Chemistry, and the process of testing the antiplatelet effect was conducted in the Laboratory of "Niculae Stăncioiu" Heart Institute Cluj-Napoca, using **Multiplate analyzer** agregometer. Biological assays were performed (platelet aggregation test) at baseline and in the 10th day.

Results and discussions

It is obvious the antiplatelet effect of aspirin by appropriate modification of the three parameters followed, quantified and automatically recorded by the software of the Multiplate analyzer device.

Initially, mean, area under the curve (AUC) of the ten patients from the first group, considered the control group, was 71.3 ± 21.34 and there was a decrease to 13.1 ± 8.33 posttreatment, statistically significantly decreased with $p < 0.0001$, as was expected. The same result was obtained for the other two parameters: total platelet aggregation and velocity (maximum slope of the aggregation curve).

AUC decrease statistically significant for the patients treated with the natural formulation based on *Allium* extract, from a mean of 64.1 ± 14.7 pretreatment to a mean of 29 ± 9.3 posttreatment with a significant decrease of total platelet aggregation and velocity parameters. This result argues the antiplatelet effect of the tested formulation-extract, with a statistically significant difference after treatment.

The difference between the mean AUC parameter posttreatment comparative for the control positive group with test group it is noticed a statistically significant difference, with $p=0.0011$, using as statistical test, the t test for independent variables. Identical for the total aggregation parameter, it was identified a $p=0.0028$, with statistical significance between the control group and test group.

Regarding the last parameter, the velocity or maximum slope (AU/minute), there was no statistically significant difference in platelet aggregation posttreatment for test group versus the control positive group, with $p=0.066$; the speed of platelet aggregation inhibition is not significantly different.

Given the significant difference between the responses posttreatment in the two groups, control and test, correlated with the intralot significant difference (patients in the test group), it can be raised the issue of a dose of extract possibly too small to achieve the antiplatelet effect of aspirin. In this context, it can be considered as a horizon for further researches, the attempt of obtaining formulations that contain a higher amount of active substance/thiosulfinates compounds, possibly by obtaining compressed tablets based on *Allium cepa* extract.

Conclusions

The synthesis pharmaceutical formulation used as positive control significantly decreased platelet aggregation by all three parameters, automatically registered in the process of platelet aggregation testing; all patients in this group had an adequate response to aspirin therapy.

Tested formulation, administered to patients in the test group, also showed a statistically significant decrease of platelet aggregation posttreatment.

Differences between the antiplatelet effect of aspirin and natural formulation tested are statistically significant for the first two and the most important parameters studied (AUC and total aggregation), which shows that the tested extract, at the dose used in this study, does not amount to the aspirin, regarding their antiplatelet effectiveness.

Originality and innovative contributions of the thesis

Currently there are no national concerns researches, in the field of obtaining *Allium cepa* extracts, with high thiosulfinates compounds content, used for their antiplatelet effect. The great majority of researches conducted nationally, approaches studies related to comparison between synthesis antiplatelet agents and not comparing them with natural products.

This project aims obtaining and characterizing a natural extract with antiplatelet properties with a small cost. This is relevant in relation to the large number of patients with cardiovascular pathology and the almost mandatory need of primary prevention.

Another utility is broadening the range of natural products with antiplatelet properties that could be commercialized, by standardizing the *Allium cepa* extract obtaining process and stabilizing it with various excipients. This may lead to the consolidation of romanian natural products industry, used in cardiovascular pathology prevention.

For the first time, part of the research contained in this thesis demonstrates, using *in vivo* studies, the antiplatelet effect of a natural product based on *Allium cepa* extract.

In a single study, there were identified most of the properties of the liquid and lyophilized *Allium cepa* extract presented in the literature (antioxidant, cytotoxic, antimicrobial and antiplatelet), the latter being the central subject of this research.