



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

*Lycium barbarum* L. și *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. –  
caracterizare fitochimică și  
activitate biologică

---

Doctorand: **Andrei-Marius Mocan**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu Oprean**

---

Cluj-Napoca 2016



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	1
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Aspecte botanice ale speciei <i>Lycium barbarum</i> L.</b>	5
1.1. Utilizări istorice în medicina tradițională	5
1.1.1. <i>Lycium barbarum</i> L. – utilizări istorice	5
1.2. <i>Lycium barbarum</i> L. – încadrare sistematică	6
1.3. <i>Lycium barbarum</i> L. – caracterizare botanică	7
<b>2. Aspecte botanice ale speciei <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	8
2.1. Utilizări istorice în medicina tradițională	8
2.1.1. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. – utilizări istorice	8
2.2. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. - încadrare sistematică	10
2.3. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. – caracterizare botanică	10
<b>3. Fitochimia speciei <i>Lycium barbarum</i> L.</b>	12
3.1. Compoziția chimică a fructelor de <i>L. barbarum</i>	12
3.1.1. Polizaharide	12
3.1.2. Carotenoide	14
3.1.3. Compuși fenolici	15
3.1.4. Alți compuși	17
3.2. Compoziția chimică a frunzelor de <i>L. barbarum</i>	18
3.2.1. Polizaharide	18
3.2.2. Compuși fenolici	19
3.3. Compoziția chimică a florilor de <i>L. barbarum</i>	20
3.3.1. Sapogenine steroidice și fitosteroli	20
3.3.2. Compuși fenolici	20
3.4. Compoziția chimică a rădăcinii și scoarței rădăcinii de <i>L. barbarum</i>	20
3.4.1. Kukoamine	20
3.4.2. Compuși fenolici	21
<b>4. Fitochimia speciei <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	22
4.1. Compoziția chimică a fructelor de <i>S. chinensis</i>	22
4.1.1. Lignani	22
4.1.2. Antociani	24
4.1.3. Triterpenoide	24
4.1.4. Ulei volatil	24
4.1.5. Compuși fenolici	24

4.1.6. Alți compuși	25
4.2. Compoziția chimică a frunzelor, tulpinilor și rădăcinilor de <i>S. chinensis</i>	25
4.2.1. Lignani și glicozide ale lignanilor	25
4.2.2. Terpenoide	25
4.2.3. Compuși fenolici	25
<b>5. Activitățile biologice ale speciei <i>L. barbarum</i> L.</b>	26
5.1. Activitățile biologice ale fructelor de <i>L. barbarum</i>	26
5.1.1. Capacitatea antioxidantă	26
5.1.2. Efectele benefice la nivel ocular	27
5.1.3. Alte activități biologice și efecte benefice	27
5.2. Activitățile biologice ale frunzelor de <i>L. barbarum</i>	27
5.2.1. Capacitatea antioxidantă	27
5.2.2. Efectul antibacterian	28
5.3. Activitățile biologice ale florilor de <i>L. barbarum</i>	28
5.3.1. Capacitatea antioxidantă	28
5.3.1. Efectul antibacterian	28
5.4. Activitățile biologice ale rădăcinilor și scoarței rădăcinilor de <i>L. barbarum</i>	28
<b>6. Activitățile biologice ale speciei <i>S. chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	29
6.1. Activitățile biologice ale fructelor de <i>S. chinensis</i>	29
6.1.1. Activitatea hepatoprotectoare	29
6.1.2. Activitatea antiinflamatoare	29
6.1.3. Activitatea imunostimulentă	29
6.1.4. Activitatea antibacteriană	30
6.1.5. Alte activități biologice	30
6.2. Activitățile biologice ale frunzelor și tulpinilor de <i>S. chinensis</i>	30
6.2.1. Activitatea antivirală	30
6.2.2. Activitatea antibacteriană	30

## CONTRIBUȚIILE PERSONALE

<b>1. Studiul 1. Caracterizarea compușilor bioactivi din frunzele de <i>L. barbarum</i> L. și <i>L. chinense</i> Mill. și determinarea activităților lor antioxidante și antimicrobiene: un studiu comparativ asupra profilului polifenolilor</b>	33
1.1. Introducere	33
1.2. Materiale și metode	34
1.2.1. Materialul vegetal și procedura de extracție	34
1.2.2. Reactivi și aparatură	34
1.2.3. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	35
1.2.4. Determinarea polifenolilor totali, flavonoidelor și derivaților de acid cafeic	35
1.2.5. Caracterizarea capacității antioxidante	36
1.2.6. Determinarea activității antimicrobiene	37
1.2.7. Analiza statistică	37

1.3. Rezultate și discuții	38
1.3.1. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	38
1.3.2. Determinarea polifenolilor totali, flavonoidelor și derivaților de acid cafeic	40
1.3.3. Caracterizarea capacității antioxidante	40
1.3.4. Determinarea activității antimicrobiene	42
1.4. Concluzii	43
<b>2. Studiul 2. Proprietățile antimicrobiene și profilul polifenolilor din frunzele și fructele de <i>Schisandra chinensis</i>: un studiu comparativ</b>	45
2.1. Introducere	45
2.2. Materiale și metode	45
2.2.1. Materialul vegetal și procedura de extracție	45
2.2.2. Reactivi	46
2.2.3. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	46
2.2.4. Determinarea activității antimicrobiene	46
2.3. Rezultate și discuții	46
2.3.1. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	46
2.3.2. Determinarea activității antimicrobiene	48
2.4. Concluzii	49
<b>3. Studiul 3. Profilul polifenolilor, capacitatea antioxidantă și proprietățile antimicrobiene ale florilor de <i>L. barbarum</i> L.</b>	50
3.1. Introducere	50
3.2. Materiale și metode	50
3.2.1. Materialul vegetal și procedura de extracție	50
3.2.2. Reactivi	50
3.2.3. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	50
3.2.4. Caracterizarea capacității antioxidante	51
3.2.5. Determinarea activității antimicrobiene	51
3.3. Rezultate și discuții	51
3.3.1. Analiza HPLC-MS a compușilor polifenolici	51
3.3.2. Caracterizarea capacității antioxidante	51
3.3.3. Determinarea activității antimicrobiene	52
3.4. Concluzii	53
<b>4. Studiul 4. Caracterizarea lignanilor și compușilor polifenolici din <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. prin HPLC-ESI-ToF-MS și HPLC-online TEAC: Contribuția compușilor individuali la capacitatea antioxidantă totală și compararea cu metode antioxidante tradiționale</b>	54
4.1. Introducere	54
4.2. Materiale și metode	56
4.2.1. Reactivi	56
4.2.2. Probe	56
4.2.3. Procedura de extracție	56
4.2.4. Separarea, identificarea și cuantificarea lignanilor și compușilor	57

polifenolici	
4.2.5. Determinarea capacității antioxidante prin metoda HPLC-DAD-online TEAC	59
4.2.6. Determinarea polifenolilor totali	60
4.2.7. Determinarea flavonoidelor totale	60
4.2.8. Determinarea capacității antioxidante prin metoda TEAC	60
4.2.9. Determinarea capacității antioxidante prin metoda EPR	60
4.2.10. Analiza statistică	61
4.3. Rezultate și discuții	61
4.3.1. Determinarea lignanilor din <i>Schisandra chinensis</i> în fructe, frunze și tulpini	61
4.3.2. Determinarea capacității antioxidante a lignanilor din <i>S. chinensis</i> prin metoda HPLC-online TEAC	66
4.3.3. Determinarea polifenolilor din <i>Schisandra chinensis</i> în fructe, frunze și tulpini	68
4.3.4. Determinarea capacității antioxidante a polifenolilor din <i>S. chinensis</i> prin metoda HPLC-online TEAC	73
4.3.5. Determinarea totalului de polifenoli și flavonoide din fructele, frunzele și tulpinile de <i>S. chinensis</i>	78
4.3.6. Determinarea capacității antioxidante prin metode tradiționale	79
4.4. Concluzii	80
<b>5. Studiul 5. Perspective privind potențialul neuroprotector și antidiabetic al <i>Schisandra chinensis</i>: Metode enzimatiche și studii de modelare moleculară ale lignanilor și polifenolilor din extracte de fructe și frunze de <i>S. chinensis</i></b>	82
5.1. Introducere	82
5.2. Materiale și metode	84
5.2.1. Materialul vegetal și procedura de extracție	84
5.2.2. Reactivi	84
5.2.3. Caracterizarea activității de inhibiție enzimatică	84
5.2.4. Caracterizarea structurală a lignanilor și polifenolilor prin HPLC-DAD/ESI-ToF-MS	86
5.2.5. Studii de modelare moleculară	86
5.3. Rezultate și discuții	88
5.3.1. Proprietățile de inhibiție enzimatică <i>in vitro</i> ale extractelor de <i>S. chinensis</i> prin metode micro-titrimetrice	88
5.3.2. Studii de modelare moleculară și dinamică moleculară	91
5.4. Concluzii	97
<b>6. Studiul 6. Conținutul funcțional din frunzele de <i>Lycium barbarum</i> L. spontan și cultivat: caracterizare fitochimică, profil biologic și studii computaționale</b>	99
6.1. Introducere	99
6.2. Materiale și metode	101
6.2.1. Materialul vegetal	101
6.2.2. Procedura de extracție	101
6.2.3. Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici	101
6.2.4. Determinarea totalului de polifenoli	102
6.2.5. Determinarea totalului de flavonoide	102

6.2.6. Determinarea capacității antioxidante prin metoda TEAC	103
6.2.7. Determinarea capacității antioxidante prin metoda EPR	103
6.2.8. Determinarea activității de inhibiție enzimatică	103
6.2.9. Studii de modelare moleculară	105
6.2.10. Determinarea activității antimicrobiene	106
6.2.11. Determinarea antimutagenității	107
6.2.12. Analiza statistică	108
6.3. Rezultate și discuții	108
6.3.1. Determinarea totalului de polifenoli și flavonoide	108
6.3.2. Caracterizarea compușilor polifenolici prin HPLC-DAD-ESI-ToF-MS	109
6.3.3. Determinarea capacității antioxidante	113
6.3.4. Determinarea activității de inhibare a $\alpha$ -amilazei, $\alpha$ -glucozidazei, colinesterazelor și tirozinazei	118
6.3.5. Studii de modelare și dinamică moleculară	119
6.3.6. Determinarea activității antibacteriene și antifungice	123
6.3.7. Determinarea antimutagenității	123
6.4. Concluzii	126
<b>7. Concluzii generale</b>	127
<b>8. Originalitatea tezei</b>	129
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b>	130

CUVINTE CHEIE: *Lycium barbarum*, *Schisandra chinensis*, HPLC-ESI-ToF-MS, HPLC-online TEAC, capacitate antioxidantă, polifenoli, lignani, activitate antimicrobiană, inhibiție enzimatică, modelare și dinamică moleculară

## INTRODUCERE

Studiile recente epidemiologice au evidențiat că plantele medicinale și alimentele de origine naturală pot fi implicate în prevenirea sau împiedicarea dezvoltării diferitelor boli. Interesul în creșterea datorită impactului lor recunoscut asupra sănătății umane, dar și datorită faptului că antioxidanții sintetici au fost incriminați ca perturbatori endocrinieni sau chiar fiind carcinogenetici. Polifenolii sunt cei mai frecvenți antioxidanți în dieta umană și posedă multiple acțiuni biologice, documentarea cu privire la cantitățile și distribuția acestora în diferite plante medicinale sau alimente naturale fiind de mare actualitate.

*L. barbarum* (cătină de garduri, gărdurariță sau mai nou goji) a devenit o plantă foarte populară în ultimii ani, fiind considerat un super-aliment prezentând proprietăți nutritive și antioxidante. Folosirea fructelor de *L. barbarum* este atestată începând cu anul 2800 î.Chr. în medicina tradițională chineză, frunzele acestei specii fiind folosite și ele în ceaiuri funcționale sau ca și condimente.

Printre constituenții descriși în fructul de *L. barbarum*, cei mai investigați compuși au fost polizaharidele, estimate a reprezenta aproximativ 5-8% din greutatea fructului uscat. O altă clasă de compuși bioactivi, carotenoidele sunt reprezentate de zeaxantină și esterii acesteia, reprezentând 0,03-0,05% din greutatea fructului uscat. În general cercetătorii din spațiul chinez și-au dedicat atenția asupra cercetării polizaharidelor din goji, în timp ce alte clase de compuși funcționali (alcaloizi, glicoproteine, tocoferoli) au fost investigate de cercetătorii din afara Chinei. Printre alți fitocompuși descriși în fructul de goji, literatura menționează cantități mici de flavonoide, acizi fenolici, steroli și betaine. Studiile recente au indicat că polizaharidele din fructul de *L. barbarum* prezintă activitate anti-aging, neuroprotectoare, anti-oboșală, hipoglicemică, de stimulare a metabolismului, antiglaucomatoasă, anticancer, citoprotectoare, imunomodulatoare și antioxidantă.

*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. este o specie vegetală medicinală indigenă în estul îndepărtat al Rusiei, nord-vestul Chinei, peninsula Korea și Insulele Sachalin. Genul *Schisandra* (*Schisandraceae*) cuprinde 25 de specii, dintre care au fost folosite istoric ca plante medicinale, *S. chinensis* și *S. repanda*. Primele studii botanice, fitochimice și farmacologice asupra speciei vegetale medicinale *S. chinensis* au fost derulate în Rusia și datează din 1927, 1940 și respectiv 1942. În medicina tradițională chineză fructele speciei *S. chinensis* sunt folosite în tratamentul disfuncțiilor sexuale, transpirațiilor nocturne, tusei astmatiforme, oboselii, diabetului, palpitațiilor și insomniei. În medicina tradițională rusă, frunțele de *S. chinensis* au fost folosite pentru îmbunătățirea vederii nocturne, ca și tonic și adaptogen dar și pentru reducerea senzației de foame. Principalii compuși activi ai *S. chinensis* sunt lignanii dibenzociclooctadienici, între care se remarcă schisandrina (schisandrolul A) și acizii organici (acid malic, citric, tartaric, și vitamina C). Lignanii se găsesc în principal în fructul (mai ales semințele) de schizandra deși cercetări mai recente au evidențiat prezența acestor compuși și în organele vegetative ale plantei (rădăcini, frunze și tulpini). Cercetările farmacologice moderne au evidențiat faptul că *S. chinensis* prezintă activitate antioxidantă, antitumorală, hepatoprotectoare, detoxifiantă și antiinflamatoare.

Până în prezent numeroase studii au avut ca obiect caracterizarea fitochimică și biologică a fructelor acestor specii vegetale de interes medicinal, totuși au fost identificate puține date în literatura de specialitate privind compoziția chimică a



frunzelor acestora sau a părților aeriene, ca surse alternative de compuși biologic activi. Mai mult, datorită importanței farmaceutice extinse ale plantelor luate în studiu, acestea au devenit cultivate în diverse areale și în România, în scop medicinal și/sau alimentar, neexistând până la ora actuală date cu privire la profilul fitochimic sau biologic al acestora.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Astfel, obiectivul general al tezei prezente a fost de a aduce noi date cu privire la compoziția chimică și profilul biologic al speciilor vegetale de interes medicinal, *L. barbarum* și *S. chinensis* cultivate în România. Teza elaborată este structurată în două părți mari, și anume **Stadiul cunoașterii**, respectiv **Contribuții personale**.

**Primul studiu** al tezei este intitulat *Characterization of bioactive constituents from L. barbarum L. and L. chinense Mill. leaves and their antioxidant and antimicrobial activities: a comparative study focusing their phenolic profiles* și a analizat profilul polifenolilor din frunzele speciei vegetale medicinale *L. barbarum* printr-un studiu comparativ cu *L. chinense*, specie a aceluiași gen mai puțin cunoscută în spațiul european. Datele fitochimice obținute au fost completate prin caracterizarea capacității antioxidante a produselor vegetale medicinale luate în studiu, și a potențialului antimicrobian al acestora. În acest prim capitol, prin rezultatele obținute, datele existente în literatură cu privire la fitochimia speciei *L. barbarum* sunt completate prin rezultate valoroase, aducând practic prin acest studiu completări importante la cunoștințele actuale în domeniu.

În studiul **al doilea** este prezentat profilul comparativ al compoziției în polifenoli a frunzelor și fructelor de *S. chinensis*. Utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă sunt aduse contribuții noi privind compoziția chimică a speciei *S. chinensis*, ca element de originalitate absolută fiind datele noi privind compoziția chimică a frunzelor. Mai mult, este realizată testarea activității antimicrobiene *in vitro*, oferind o orientare practică rezultatelor obținute.

În **studiul al treilea**, este analizată compoziția chimică a florilor de *L. barbarum*. Acest studiu aduce un mare grad de noutate datorită datelor aproape inexistente în literatura de specialitate. Acidul clorogenic și rutozida sunt astfel identificați ca și compuși majoritari ai florilor de *L. barbarum* prin tehnica HPLC-MS, alături de alți compuși din clasa polifenolilor.

**Al patrulea studiu** inclus în teză este menit să aducă noi lămuriri cu privire la capacitatea antioxidantă a frunzelor și tulpinilor în raport cu fructele de *S. chinensis*, considerate până acum ca resturi de ale procesării în industria farmaceutică sau alimentară a *S. chinensis*. Mai mult, utilizând tehnica “state of the art” a cuplării HPLC cu detecția online-TEAC – HPLC-online TEAC, sunt identificați compușii responsabili de activitatea antioxidantă a matricilor analizate, totodată calculând contribuția individuală a acestora (lignani și polifenoli) la activitatea antioxidantă totală, exprimată în echivalenți Trolox. Rezultatele acestui studiu indică acizii clorogenici și glicozidele cvercitolului ca fiind responsabili de peste 80% din totalul activității

antioxidante a frunzelor, în timp ce singurul lignan capabil să reacționeze cu reactivul ABTS a fost gomisina D.

**Al cincilea studiu** din teză aduce noi date cu privire la potențialul antidiabetic și neuroprotector al extractelor de fructe și frunze de *S. chinensis* testând *in vitro* prin metode micro-titrimetrice activitatea de inhibiție enzimatică a unor enzime cheie implicate în patologia Alzheimer și respectiv a diabetului (colinesterazele și respectiv  $\alpha$ -amilaza și  $\alpha$ -glucozidaza). Rezultatele obținute prin testările *in vitro* efectuate au fost mai apoi confirmate prin studii computaționale de andocare moleculară încercând astfel stabilirea unor relații între compușii bioactivi majoritari identificați în studiul anterior și inhibiția enzimelor testate, respectiv în modularea răspunsului biologic.

În **studiul al șaselea** este prezentat un studiu comparativ între frunzele de *L. barbarum* recoltate din flora spontană și respectiv cultivate. Analiza fitochimică a fost realizată prin spectrometrie de masa de tip "Time of Flight" – ToF-MS, rezultatele indicând acidul clorogenic și rutozida ca și compuși majoritari în frunzele de *L. barbarum* cultivat. Din punct de vedere cantitativ frunzele celor două cultivare de *L. barbarum* s-au dovedit mult mai bogate în compuși bioactivi decât cele recoltate din flora spontană. De asemenea, în vederea caracterizării biologice a matricilor vegetale studiate, a fost determinată comparativ capacitatea antioxidantă a acestora, activitatea antimicrobiană, respectiv de inhibiție a cholinesterazelor,  $\alpha$ -amilazei și  $\alpha$ -glucozidazei și a tirozinazei. Mai mult, activitatea superioară de inhibiție a tirozinazei a fost mai departe studiată prin andocarea moleculară a acidului clorogenic, compusul major determinat.



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**DOCTORAL SCHOOL**

---

SUMMARY OF PHD THESIS

*Lycium barbarum* L. and *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. –  
phytochemical and biological  
activity characterization

---

PhD student: **Andrei-Marius Mocan**

---

Scientific supervisor: **Prof. Radu Oprean, PhD**

---

Cluj-Napoca 2016

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>STATE OF THE ART</b>	
<b>1. Botanical aspects of <i>Lycium barbarum</i> L.</b>	5
1.1. Historical uses as traditional medicine	5
1.1.1. <i>Lycium barbarum</i> L. – historical uses	5
1.2. <i>Lycium barbarum</i> L. – systematics	6
1.3. <i>Lycium barbarum</i> L. – botanical characteristics	7
<b>2. Botanical aspects of <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	8
2.1. Historical uses as traditional medicine	8
2.1.1. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. – historical uses	8
2.2. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. - systematics	10
2.3. <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. – botanical characteristics	10
<b>3. Phytochemistry of <i>Lycium barbarum</i> L.</b>	12
3.1. Chemical composition of <i>L. barbarum</i> fruits	12
3.1.1. Polysaccharides	12
3.1.2. Carotenoids	14
3.1.3. Phenolics	15
3.1.4. Other compounds	17
3.2. Chemical composition of <i>L. barbarum</i> leaves	18
3.2.1. Polysaccharides	18
3.2.2. Phenolics	19
3.3. Chemical composition of <i>L. barbarum</i> flowers	20
3.3.1. Steroidal sapogenins and phytosterols	20
3.3.2. Phenolics	20
3.4. Chemical composition of <i>L. barbarum</i> roots and roots' bark	20
3.4.1. Kukoamines	20
3.4.2. Phenolics	21
<b>4. Phytochemistry of <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	22
4.1. Chemical composition of <i>S. chinensis</i> fruits	22
4.1.1. Lignans	22
4.1.2. Anthocyanins	24
4.1.3. Triterpenoids	24

4.1.4. Essential oil	24
4.1.5. Phenolics	24
4.1.6. Other compounds	25
4.2. Chemical composition of <i>S. chinensis</i> leaves, stems and roots	25
4.2.1. Lignans and lignan glycosides	25
4.2.2. Terpenoids	25
4.2.3. Phenolics	25
<b>5. Biological activities of <i>L. barbarum</i> L.</b>	26
5.1. Biological activities of <i>L. barbarum</i> fruits	26
5.1.1. Antioxidant capacity	26
5.1.2. Eye-health benefits	27
5.1.3. Further biological activities and health benefits	27
5.2. Biological activities of <i>L. barbarum</i> leaves	27
5.2.1. Antioxidant capacity	27
5.2.2. Antibacterial effects	28
5.3. Biological activities of <i>L. barbarum</i> flowers	28
5.3.1. Antioxidant capacity	28
5.3.1. Antibacterial activity	28
5.4. Biological activities of <i>L. barbarum</i> roots/roots' bark	28
<b>6. Biological activities of <i>S. chinensis</i> (Turcz.) Baill.</b>	29
6.1. Biological activities of <i>S. chinensis</i> fruits	29
6.1.1. Hepatoprotective activity	29
6.1.2. Anti-inflammatory activity	29
6.1.3. Immunostimulant activity	29
6.1.4. Antibacterial activity	30
6.1.5. Further biological activities	30
6.2. Biological activities of <i>S. chinensis</i> leaves and stems	30
6.2.1. Antiviral activity	30
6.2.2. Antibacterial activity	30

## PERSONAL CONTRIBUTION

<b>1. Study 1. Characterization of bioactive constituents from <i>L. barbarum</i> L. and <i>L. chinense</i> Mill. leaves and their antioxidant and antimicrobial activities: a comparative study focusing their phenolic profiles</b>	33
1.1. Introduction	33
1.2. Materials and methods	34
1.2.1. Plant materials and extraction procedure	34
1.2.2. Chemicals and instruments	34

1.2.3. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	35
1.2.4. Determination of total phenolics, flavonoids and caffeic acid derivatives content	35
1.2.5. Antioxidant assays	36
1.2.6. Determination of antimicrobial activity	37
1.2.7. Statistical analysis	37
1.3. Results and discussions	38
1.3.1. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	38
1.3.2. Determination of total bioactive compounds	40
1.3.3. Antioxidant activity assays	40
1.3.4. Antimicrobial activity	42
1.4. Conclusions	43
<b>2. Study 2. Antimicrobial properties and phenolic profile of <i>Schisandra chinensis</i> leaves and fruits: a comparative study</b>	45
2.1. Introduction	45
2.2. Materials and methods	45
2.2.1. Plant materials and extraction procedure	45
2.2.2. Chemicals and reagents	46
2.2.3. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	46
2.2.4. Determination of antimicrobial activity	46
2.3. Results and discussions	46
2.3.1. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	46
2.3.2. Antimicrobial activity	48
2.4. Conclusions	49
<b>3. Study 3. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial effects of <i>L. barbarum</i> L. flowers</b>	50
3.1. Introduction	50
3.2. Materials and methods	50
3.2.1. Plant material and extraction procedure	50
3.2.2. Chemicals and reagents	50
3.2.3. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	50
3.2.4. Antioxidant assays	51
3.2.5. Determination of antimicrobial activity	51
3.3. Results and discussions	51
3.3.1. HPLC-MS analysis of phenolic compounds	51
3.3.2. Antioxidant activity assays	51
3.3.3. Antimicrobial activity	52
3.4. Conclusions	53
<b>4. Study 4. Characterization of lignans and phenolic components of <i>Schisandra</i></b>	54

**chinensis (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-ToF-MS and HPLC-online TEAC: Contribution of individual components to overall antioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays**

4.1. Introduction	54
4.2. Materials and methods	56
4.2.1. Chemicals	56
4.2.2. Samples	56
4.2.3. Extraction procedure	56
4.2.4. Separation, identification and quantification of lignans and phenolic compounds	57
4.2.5. Determination of the antioxidant capacity using HPLC-DAD-online TEAC	59
4.2.6. Total phenolic content (TPC)	60
4.2.7. Total flavonoid content (TFC)	60
4.2.8. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay	60
4.2.9. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry	60
4.2.10. Statistical analysis	61
4.3. Results and discussions	61
4.3.1. Identification of lignans in <i>Schisandra chinensis</i> depending on the plant part	61
4.3.2. Antioxidant capacity of lignans from <i>S. chinensis</i> as determined using the HPLC-online TEAC approach	66
4.3.3. Phenolic compounds in <i>Schisandra chinensis</i> fruits, leaves, and stems	68
4.3.4. Antioxidant capacity of the phenolic compounds from <i>S. chinensis</i> as determined using the HPLC-online TEAC approach	73
4.3.5. Total phenolic and flavonoid content of <i>S. chinensis</i> fruits, leaves, and stems	78
4.3.6. Traditional antioxidant assays	79
4.4. Conclusions	80
<b>5. Study 5. Insights into the neuroprotective and antidiabetic potential of <i>Schisandra chinensis</i>: Enzymatic assays and molecular modeling studies of <i>S. chinensis</i>' lignans and phenolics from fruits and leaves extracts</b>	<b>82</b>
5.1. Introduction	82
5.2. Materials and methods	84
5.2.1. Plant material and extraction procedure	84
5.2.2. Chemicals and reagents	84
5.2.3. Enzyme inhibitory activity	84
5.2.4. Structural investigation and characterization of lignans and phenolic compounds by HPLC-DAD/ESI-ToF-MS	86
5.2.5. Molecular modeling studies	86
5.3. Results and discussions	88
5.3.1. <i>In vitro</i> enzyme inhibitory properties of <i>S. chinensis</i> extracts by microtiter assays	88

5.3.2. Molecular modeling and molecular dynamic studies	91
5.4. Conclusions	97
<b>6. Study 6. Functional constituents of wild and cultivated Goji (<i>Lycium barbarum</i> L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile and computational studies</b>	99
6.1. Introduction	99
6.2. Materials and methods	101
6.2.1. Plant samples	101
6.2.2. Extraction procedure	101
6.2.3. Separation, identification, and quantification of phenolic compounds	101
6.2.4. Total phenolic content (TPC)	102
6.2.5. Total flavonoid content (TFC)	102
6.2.6. Trolox equivalent antioxidant (TEAC) assay	103
6.2.7. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy	103
6.2.8. Enzyme inhibitory activity	103
6.2.9. Molecular modeling studies	105
6.2.10. Antimicrobial activity	106
6.2.11. Antimutagenicity	107
6.2.12. Statistical analysis	108
6.3. Results and discussions	108
6.3.1. Total phenolic (TPC) and flavonoid content (TFC)	108
6.3.2. Characterization of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI-ToF-MS	109
6.3.3. Antioxidant activity assays	113
6.3.4. Inhibitory activities against selected carbohydrate hydrolases, cholinesterases, and tyrosinase	118
6.3.5. Molecular modeling studies and dynamics	119
6.3.6. Antibacterial and antifungal activity	123
6.3.7. Antimutagenicity testing	123
6.4. Conclusions	126
<b>7. General conclusions</b>	127
<b>8. Originality of thesis</b>	129
<b>REFERENCES</b>	130

**KEYWORDS:** *Lycium barbarum*, *Schisandra chinensis*, HPLC-ESI-ToF-MS, HPLC-online TEAC, antioxidant capacity, phenolics, lignans, antimicrobial activity, enzyme inhibition, molecular modeling studies and dynamics



## INTRODUCTION

Medicinal plants and natural products represent a source of inspiration in the design of new therapeutic agents against several diseases. Moreover, they still are considered a primary source of healthcare in many developing countries. Additionally, in western societies medicinal plants, herbal extracts, and phytochemicals are broadly used as food supplements, drugs, and traditional medicine. Many of them have health-promoting effects and, consequently, are marketed as such. However, there are cases when herbal remedies that claim health-benefits which are still not scientifically demonstrated.

In many cases where scientific evidence is needed in order to demonstrate the efficacy of herbal remedies, the first investigated health-claims are the ones related to the traditional usage of the respective plant or folk-remedy, but not exclusively.

Besides the growing interest in medicinal plants and natural products research, nowadays a competing trend in cultivating different medicinal plants outside of their geographic area and closer to the places where they will be processed can be observed resulting in improved traceability and reduced safety concerns.

*Lycium barbarum* L. (*Solanaceae*) is a medicinal plant coming from the Chinese Traditional Medicine and nowadays facing a worldwide recognition as a medicinal plant and super-food, its fruits, leaves, roots and roots' bark being consumed today as fresh or dried (fruits), in teas (fruits, leaves), or in several dietary supplements (all). Moreover, infusions prepared from the berries, leaves, and roots' bark have a history of use as ingredients in various soft or alcoholic drinks (berries) or marketed for their benefits to anti-aging (berries), vision (berries), kidney (berries), liver functions (berries, leaves) and anti-inflammatory (roots' bark).

*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (*Schisandraceae*) is a widely-known medicinal and edible plant used in Russian and Chinese Traditional Medicine as an adaptogenic and hepatoprotective agent. Its fruits, leaves and stems are edible and used in different pharmaceutical preparations or dietary supplements to treat liver disorders, chronic cough and insomnia or as flavoring agents.

Due to the increasing popularity of medicinal plants used as Traditional Chinese medicines in western societies (Europe, North America), many pharmaceutical preparations or dietary supplements containing different plant parts (organs) from *L. barbarum* or *S. chinensis* can be found in Romanian pharmacies, herbal drug stores or supermarkets. Moreover, both these medicinal plants are successfully cultivated in different regions of Romania and further used in the development of herbal drugs or dietary supplements.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

Considering these aspects, this thesis aimed to bring original data considering the chemical composition and several biological effects of *L. barbarum* and *S. chinensis* cultivated in Romania. The thesis gathers two main parts, namely the **State of the art** and **Personal contributions**.

**The first study** of the thesis is entitled *Characterization of bioactive constituents from L. barbarum L. and L. chinense Mill. leaves and their antioxidant and antimicrobial activities: a comparative study focusing their phenolic profiles* and presents the phenolic profile from the leaves of *L. barbarum* in comparison with *L. chinense*, another species from the genus *Lycium*. The obtained phytochemical results were further completed by characterizing the antioxidant capacity of the investigated herbal samples, as well as their antimicrobial potential. The results of this first study brought new data concerning the phytochemical profile of *L. barbarum* leaves, suggesting their uses as alternative sources of functional constituents for phytopharmaceuticals.

**The second study** presents the comparative profile of phenolic compounds from leaves and fruits of *S. chinensis* by using HPLC-MS techniques. The originality of the study comes from the fact that brings new data concerning the chemical profile of *S. chinensis* leaves. Moreover, the *in vitro* antimicrobial activity was tested giving a further practical orientation to the phytochemical results.

**The third study** analyses the chemical profile of *L. barbarum* flowers. The study brings a high level of novelty due to the fact that up-to-date no further chemical data is available on this topic. Moreover, chlorogenic acid and rutin were identified by LC-MS as main compounds, besides other phenolics.

**The fourth study** aimed to characterize the contribution of single constituents (lignans and further phenolics) to the overall antioxidant activity using an HPLC-online TEAC approach. By using LC-DAD/ESI-ToF-MS, twenty-eight lignans and twenty phenolic compounds were identified. Among the 48 characterized components, twelve phenolic compounds were identified for the first time in *Schisandra*. The present study provided new information about the lignan and phenolic profiles of fruits, leaves, and stems from *S. chinensis* grown in Central Europe, i.e. Romania. While the fruits proved containing high amounts of lignans, leaves and stems also contained significant amounts of phenolic compounds, especially from the groups of phenolic acids and flavonoids, a fact that was underestimated before. This demonstrates that besides dibenzocyclooctadiene lignans, further phenolic compounds are also an important class of secondary metabolites provided by this plant, and may therefore be considered as possible markers of authenticity in chemotaxonomic studies and quality control. The recently developed LC-online TEAC methodology proved to be a suitable and rapid assessment for the characterization of antioxidant compounds in complex mixtures, in this case the *S. chinensis* extracts. Additionally, the assessment of this method in this study showed for the first time that not only phenolic compounds, but also lignans are

suitable to be evaluated towards it. However, the only lignan that proved to be a good radical scavenger was gomisin D suggesting that not its amount but rather its unusual chemical structure is determinant in this case. This fact may be an important argument and could serve as an additional quality marker. The high antioxidant activity of the leaves is generated by the phenolic compounds. Overall, chlorogenic acid isomers and quercetin glycosides proved to contribute over 80% of the total antioxidant activity. This is the first report where the antioxidant activity of *S. chinensis* and the contribution of its single components (i.e. lignans and phenolic compounds) to the total antioxidant activity are assessed by using an HPLC-online coupling method.

Although *S. chinensis* fruits have been widely studied, this study reports that distinct potentials in terms of antioxidant capacity of each individual part of the plant are linked to different classes of secondary metabolites. Therefore and according to the target application, leaves, and stems of *S. chinensis*, to date regarded as a waste from *Schisandra* processing, could also be considered as a raw material for obtaining bioactive formulations and functional foods.

**The fifth study** aimed to investigate the enzyme inhibitory potential on selected carbohydrate hydrolases, cholinesterases and tyrosinase of extracts from fruits and leaves of *Schisandra* in relation with their main bioactive compounds. Furthermore, the interactions between dominant compounds (schisandrol A, schisandrol B, schisandrin B and cinnamic acid) from extracts and selected enzymes were investigated by molecular modeling and molecular dynamics studies in order to explain at a molecular level our findings. Computational techniques have been successfully used for the prediction of ligand-target binding affinity and to better understand the molecular basis of the biological responses. *In silico* studies also provided additional insights into the possible mechanism of action and binding mode of active compounds against metabolic key enzymes.

**The sixth study** aimed to investigate the bioactive composition, antioxidant, enzyme-inhibitory, antimicrobial, and antimutagenic properties of two selected Goji cultivars in comparison with leaves from wild-growing plants. Phytochemical analysis was assessed by LC-ESI-ToF-MS techniques, indicating chlorogenic acid and rutin as main bioactive compounds from leaves of cultivated *L. barbarum*. The results showed that leaves from cultivated plants contain higher amounts of chlorogenic acids and flavonoid glycosides than wild growing plants, but the latter had a more diversified phenolic profile. Furthermore, for the biological characterization of the analyzed herbal drugs the antioxidant capacity was determined as well as the inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, cholinesterases, and tyrosinase. Furthermore, the interaction between chlorogenic acid (as main bioactive compound) and tyrosinase was evaluated by molecular docking and molecular dynamics studies.