

Ph.D. értekezés tézisei

***Coffea* fajok hisztológiai, fitokémiai és antimikrobás  
hatásának vizsgálata**

**Patay Éva Brigitta**

Témavezető:  
Dr. Papp Nóra PhD

Programvezető:  
Prof. Dr. Deli József

Doktori Iskola vezetője:  
Prof. Dr. Pintér Erika



Pécsi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Farmakognóziái Intézet  
Pécs, 2017.

## 1. Bevezetés

A *Coffea* (kávé) fajokat az Egyenlítő mentén szinte minden országban termesztik. A FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) szerint termesztése elérheti a 7 millió tonnát is évente (BAEZA et al. 2014). A nemzetség számos tagja termesztés szempontjából nagy múlttal rendelkezik, fontos szerepet töltenek be a világgiacon és a kutatásban egyaránt. A népszerű ital-alapanyagként ismert növények napjainkban kereskedelmi szempontból a kőolaj után második helyen állnak a világgiacon és több mint 50 országban közel 20 millió gazdálkodó család megélhetését biztosítják (DAVIS et al. 2007).

A jelentős koffein- és polifenol-tartalomnak köszönhetően a *Coffea* kivonatok számos fiziológiai hatással rendelkeznek, így központi idegrendszer stimuláló, antioxidáns, rákmegelőző, gasztrointesztinális, antibakteriális és dermatológiai hatást jegyeztek fel. A tudományos bizonyítékokkal alátámasztott jótékony hatások mellett azonban a kávé nem megfelelő koncentrációban való alkalmazása súlyos mellékhatásokat is előidézhet.

A legismertebb fajok, így a *Coffea arabica* L., *C. robusta* L. Linden és *C. liberica* Hiern. mellett vadon élő taxonok esetében viszonylag kevés információval rendelkezünk biológiai és fitokémiai jellemzőikről.

## 2. Célkitűzések

A kávé tudományos adatai és társadalomra gyakorolt jelentős hatása alapján a dolgozat célkitűzései a következők voltak:

- a *C. arabica*, *C. liberica* és a *C. benghalensis* B. Heyne ex Schult. hisztológiai és fitokémiai jellemzőinek, valamint antimikrobás hatásának összehasonlító vizsgálata, így:
- a kijelölt 3 *Coffea* faj esetében a lomblevél, levélnyel és termés hisztológiai jellemzése
- polifenolok mennyiségi és minőségi meghatározása a levél-, érett és éretlen termés-kivonatokban HPLC módszerrel
- összecszerzőanyag- és összpolicenoltartalom meghatározása lomblevél- és termés-kivonatokban
- a 3 taxon termésfal- és magkivonatának antioxidáns vizsgálata ECL (Enhanced Chemiluminescence), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) és ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) módszerekkel

- lomblevél, termésfal és mag antimikrobás hatásának vizsgálata a 3 taxon esetében korong- és agardiffúziós módszerrel
- a fentiek alapján a *C. benghalensis* korábbi tudományos eredményeinek kiegészítése új adatokkal, a faj esetleges gazdasági jelentőségének vizsgálata új természetes antioxidáns források felkutatása, valamint a kávé-maradványok (hulladék) új felhasználási lehetőségei révén.

### 3. *Coffea* taxonok hisztológiai vizsgálata

#### 3.1. Anyagok és módszerek

##### 3.1.1. Mintaelőkészítés

A *C. arabica*, *C. benghalensis* és *C. liberica* mintáit (lomblevél, levélnyel, termés, hajtás) a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjéből gyűjtöttük 2014 és 2015 tavaszán (Pécs: tszf. magasság: 193 m, északi szélesség: 46°04'59", keleti hosszúság: 18°13'59"). A kert adatai szerint a *C. arabica* 2008-ban Konstanz-ból (Németország, ültetés: 2009. február 26.), a *C. liberica* 2011-ben Giessen-ből (Németország, ültetés: 2012. április 17.) érkezett. A *C. benghalensis* származását tekintve nem állt rendelkezésre elegendő adat; a vizsgált növény megközelítőleg 10 éves. A növények nyáron kint, téli időszakban üvegházakban telelnek át (12-15 °C, 40-60% páratartalom).

Fajonként 2-2 egyedről gyűjtöttünk mintákat (10-10 hajtás, levélnyel és termés, valamint 20 lomblevél), amelyeket szobahőmérsékleten, hűvös helyen szárítottunk. Lomblevelek esetében 10 minta levélderítést, 10 minta fixálást (96% etanol:glicerin:víz, 1:1:1) követően preparátumkészítés során került vizsgálatra. A vizsgálatokat a PTE GYTK Farmakognóziái Intézetben végeztük.

##### 3.1.2. Levélderítés

A levélderítés során a szárított mintákat 1x1 cm méretre vágtuk mindhárom faj esetében (20 db/növény). Első lépésben forralás történt 15 ml vízben, ezután 10% etanol:KOH 7:3 keverékében (15 ml, 3-4 perc), majd 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ban (4 ml, 1 perc), amelyben álltak is a minták 10 percig. Ezt követően desztillált vízzel mosás, majd újabb forralás következett 96% etanolban, míg a minták elszintelenedtek. Újabb desztillált vízben történt mosás után a szintelen mintákat tárgylemezre helyeztük. Fajonként 10 mintát festés nélkül, 10 mintát

0,02% toluidinkékkel festve, 2-3 csepp Neo-Mounttal és fedőlemezzel rögzítve készítettünk. A kész preparátumok vizsgálata Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal és SPOT BASIC v4.0 program segítségével történt.

### **3.1.3. Beágyazás és metszetkészítés**

Az etanol:glicerin:víz elegyében fixált hajtás, levélnyel, lomblevél és termés-mintákat mindhárom taxon esetében 70% és 90% acetonnal (1-1 óra), 100% acetonnal (1 éjszaka) és xilollal (2 óra) kezeltük, majd Technovit 7100 műgyantába ágyaztuk. A 10 µm vastagságú kereszt- és hosszmetsetek készítése Anglia Scientific 0325 típusú rotációs mikrotómmal történt. A metszeteket 50°C-on szárítottuk (Memmert Basic UNB200, 32 L, 2 óra), majd 0,02% toluidinkékkel festettük (5 perc). Ezután desztillált vízzel mosás (néhány másodperc), majd kezelés történt 96% etanollal (2x5 perc), izopropanollal (2 perc) és xilollal (2x10 perc). Végül Neo-Mount fixálóval és fedőlemezzel fedtük a kész preparátumokat.

A preparátumokat Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal és SPOT BASIC v4.0 program segítségével, a mikromorfológiai bélyegeket Image Tool 3.00 és Image J programokkal (20 mérés/minta/növény) vizsgáltuk. A mért paraméterek a következők voltak: kutikula vastagsága, epidermiszsejtek, oszlopos és szivacsos alapszöveti sejtek magassága, szállítónyalábok szélessége a lomblevélben és a levélnyelben (µm).

### **3.1.4. Statisztikai módszerek**

A mikromorfometriai adatok elemzése Past 2.17b program segítségével történt. Első lépésként Shapiro-Wilk teszt segítségével vizsgáltuk az adatok eloszlását. A normál eloszlású adatok esetében az összehasonlítást One-way-ANOVA varianciaanalízis (Tukey páronkénti összehasonlítás) segítségével végeztük. Amennyiben az egyes csoportok esetében a normalitás nem teljesült, Kruskal-Wallis tesztet (Mann-Whitney páronkénti összehasonlítás) alkalmaztunk.

## **3. 2. Eredmények és értékelés**

### **3.2.1. Levélderítés**

A *C. arabica* leveleire elágazások nélküli, vastag szállítónyalábok, a *C. benghalensis* esetében kis elágazások, míg a *C. liberica* esetében hosszú

elágazások jellemzők. A babszem alakú zárósejtek melléksejtjeinek száma mindhárom taxon esetében 3 volt (anizocitikus sztóma).

### 3.2.2. Hisztológiai jellemzők

#### 3.2.2.1. *Coffea* fajok leveleinek hisztológiai vizsgálata

A vizsgált kávéfajok lomblevél-szerkezete néhány kisebb eltéréssel közel azonosnak bizonyult. Az egysejtsoros abaxiális és adaxiális epidermiszt vékony kutikula borítja mindhárom faj esetében. Az arab kávé abaxiális (26,55  $\mu\text{m}$ ) és adaxiális (27,18  $\mu\text{m}$ ) epidermiszsejtjei magasabbak, míg a libériai kávé epidermiszsejtjeit szélesebbnek mértük (36,67 és 32,66  $\mu\text{m}$ ).

Az arab és libériai fajokkal szemben a bengáli kávé kutikulavastagsága mindkét epidermiszrétegen kiemelkedő (8,61 és 8,69  $\mu\text{m}$ ). A dorziventrális levelek heterogén mezofillummal rendelkeznek mindegyik faj esetében, amely oszlopos (adaxiális epidermisz felé) és izodiametrikus sejtekből álló szivacsos (abaxiális epidermisz felé) alapszöveti sejteket foglal magában. A kloroplasztiszokban gazdag oszlopos alapszöveti sejtek klorenchimát alkotnak, amelyek az arab és libériai faj esetében egy sejt sorban, míg a bengáli kávéban két sorban helyezkednek.

A *C. arabica* levélen az adaxiális és abaxiális kutikula vastagságát (5,06 és 3,57  $\mu\text{m}$ ), valamint az epidermiszsejtek magasságát (26,55 és 27,18  $\mu\text{m}$ ) nagyobbak mértük, míg az oszlopos és szivacsos sejtek (30,00 és 31,25  $\mu\text{m}$ ) kisebbek, eltérve korábbi irodalmi adatoktól (FILHO 2006). Ennek okai a vizsgálat során alkalmazott eltérő módszerek és eltérő környezeti feltételek lehetnek. Mindegyik faj esetében a szivacsos alapszöveti sejtek között intercelluláris tereket és Ca-oxalát kristályokat figyeltünk meg. Bár a bengáli kávé oszlopos alapszöveti sejtei magasabbak (52,77 és 13,88  $\mu\text{m}$ ), a szállítónyalábok szélesebbek (267,93  $\mu\text{m}$ ) voltak, az arab kávé szivacsos alapszöveti sejtjeit magasabbnak (31,25 és 38,20  $\mu\text{m}$ ) mértük.

A sztómák mezomorf helyzetűek; a szklerenchimasejtekkel körülvett, kollaterális zárt szállítónyalábok fa- és hancselemekből épültek fel kambium nélkül mindhárom taxon esetében.

**Statisztikai értékelés:** Eltérések a *C. arabica* faj abaxiális epidermisz- és szivacsos alapszöveti sejtek paramétereiben voltak megfigyelhetők, ahol az adaxiális epidermiszsejteket magasabbnak mértük a *C. liberica* fajhoz képest. A *C. arabica* levelének szállítónyalábjai szélesebbek voltak a *C. benghalensis*-hez képest, míg ezutóbbi oszlopos alapszöveti sejtjei magasabbak, a kutikula

vastagabb volt a másik két fajhoz viszonyítva. A *C. liberica* abaxiális epidermiszsejtjeit szélesebbnek mértük összevetve a másik 2 vizsgált fajjal.

### **3.2.2.2. Coffea fajok levélnyelének hisztológiai vizsgálata**

A levélnyel hisztológiai paraméterei mindhárom taxon esetében hasonlóan bizonyultak: egysejtsoros epidermisz, kollaterális zárt szállítónyalábok, izodiametrikus sejtekből álló parenchima és szklerenchimasejtek figyelhetők meg. A központi zárt szállítónyaláb kör alakú, amely a *C. arabica* esetében 6, a *C. benghalensis* esetében 4 kisebb nyalábban folytatódik. A *C. liberica* levélnyelében csak egy központi nyaláb figyelhető meg. Ca-oxalát kristályok jelenléte mindhárom mintára jellemző. Az arab (39,75 és 38,25  $\mu\text{m}$ ) és bengáli kávé parenchimasejtjeinek (32,57 és 38,28  $\mu\text{m}$ ) értékei hasonlóak voltak, ennek ellenére a bengáli kávé levélnyel epidermiszsejtjei a színi és fonáki oldalon is magasabbak (23,17/19,49 és 20,94/18,39  $\mu\text{m}$ ), a szállítónyalábok szélesebbek (287,51  $\mu\text{m}$ ) voltak a másik két fajjal szemben.

**Statisztikai értékelés:** A *C. benghalensis* levélnyele mutatta statisztikai szempontból a legtöbb eltérést: az adaxiális és abaxiális epidermiszsejtek szélessége és az adaxiális kutikula vastagsága is nagyobbak bizonyult, mint a *C. arabica* és *C. liberica* értékei, míg a parenchimasejtek szélessége és magassága, valamint a szállítónyalábok szélessége közel azonos volt a *C. arabica* mért adataival. Az arab kávé levélnyel abaxiális epidermiszsejtjeinek szélessége, a parenchima és kutikula vastagsága megegyezett a libériai faj mért értékeivel.

### **3.2.2.3. Coffea fajok hajtásának hisztológiai vizsgálata**

A levélhez és levélnyelhez hasonlóan a hajtást is egysejtsoros epidermisz borítja mindhárom faj esetében. Az elsődleges kéreg az arab kávéban volt a legvastagabb (10-12 sejtsor), ezt követte a bengáli kávé (7-8 sejtsor) és a libériai kávé (6-8 sejtsor). Ezek a sejtek izodiametrikusak az arab és libériai, míg a bengáli kávé esetében 5-6 soros külső sejtekből és lapított belső izodiametrikus sejtekből állnak. A központi nyílt szállítónyalábokat, amelyek kambiumból, fa- és háncselemekből állnak, egy sorban szklerenchimasejtek veszik körül mindegyik faj esetében. Az alapszöveti sejtek mindhárom taxon esetében izodiametrikusak. Bár a bengáli kávé epidermiszsejtjei a legmagasabbak mindkét oldalon (16,41 és 17,39  $\mu\text{m}$ ), a

libériai kávé esetében a parenchimasejtek bizonyultak a legmagasabbnak (43,64 és 46,21  $\mu\text{m}$ ) a vizsgált fajok között.

**Statistikai értékelés:** A legmagasabb és legszélesebb parenchimasejtek libériai kávé esetében voltak jelen, míg az epidermiszsejteket a bengáli fajban mértük legmagasabbnak. Statisztikai szempontból eltéréseket nem találtunk az epidermiszsejtek szélességében.

#### **3.2.2.4. Coffea fajok termésének hisztológiai vizsgálata**

A termések mindhárom taxon esetében a nemzetségre jellemző két egymás felé forduló magot tartalmaznak, amelyek külső oldala domború, az egymással szemben álló oldalak lapítottak. A termésfalat minden esetben egysejtes epidermisz borítja. Az alapszöveti sejtek főként izodiametrikusak. A magok körül kollaterális zárt nyalábok helyezkednek el. A bengáli kávé esetében 2-3 sorban hosszú szklereidák is megfigyelhetők. Az epidermiszsejtek magassága és szélessége közel azonos volt az arab (11,22 és 15,07  $\mu\text{m}$ ) és a bengáli (17,22 és 13,35  $\mu\text{m}$ ) faj esetében; a bengáli kávé mutatta a legnagyobb parenchimasejteket (28,03 és 51,67  $\mu\text{m}$  magasság és szélesség). A termések mérete miatt fénymikroszkópos vizsgálatot nem tudtunk végezni, így makroszkópos módszerrel és képen hasonlítottuk össze jellemzőiket, teljes mikroszkópos kép készítése nélkül.

**Statistikai értékelés:** Az epidermiszsejtek a *C. benghalensis* és *C. liberica* esetében voltak a legmagasabbak, míg a parenchimasejtek a *C. benghalensis* esetében a legszélesebbek. Statisztikai eltéréseket nem találtunk a 3 vizsgált taxon termés epidermiszsejtjeinek szélességében és magasságában.

### **4. Coffea fajok fitokémiai vizsgálata**

#### **4.1. Anyagok és módszerek**

##### **4.1.1. Mintaelőkészítés**

A 3 kijelölt faj fitokémiai vizsgálataihoz lomblevelet és termést gyűjtöttünk a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjében 2014 és 2015 tavaszán (fajonként 2 egyedről). A vizsgálatokat a PTE GYTK és SOTE GYTK Farmakognóziai Intézetben, valamint a kolozsvári Iuliu Hatieganu Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézetében végeztük.

A HPLC-ESI/MS vizsgálatokhoz a *C. arabica* és *C. benghalensis* esetében 2,5 g száraz és porított levél, éretlen termésfal és termés szerepelt

mintaként, amelyekből 5% etanol (47,5 ml) hozzáadásával hidrolizált és nem hidrolizált kivonatokat készítettünk.

A HPLC-ESI-MS/MS vizsgálatokhoz mindhárom taxon előzetesen említett szárított és porított mintáiból kivonatot készítettünk (Soxhlet, metanol:deszillált víz 70:30 v/v%). A kivonás 150 ml kivonószerezellel történt 8 órán át. Az oldószer elpárologtatása után (rotációs vákuumbepárló, 60 °C) visszamaradt mintát metanol-deszillált víz keverékében oldottuk (5 ml, 70:30 v/v%). Az apoláris anyagokat petróleummal folyadék-folyadék kivonással eltávolítottuk. Vizsgálat előtt minden minta esetében SPE tisztításra (500 mg/3ml Supelco Supelclean LC-18 SPE, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) és szűrésre került sor (Sartorius Minisart RC15 0,2 µm, Goettingen, Germany). A komponensek azonosításához klorogénsav standardot, valamint szakirodalmi adatokat használtunk.

Az összpolicfenol- és összcserzőanyagtartalmat 0,5 g száraz és porított éretlen és érett termésfalban és magban vizsgáltuk 150 ml deszillált vízzel, majd melegítettük (30 perc, 70 °C). A hűtött kivonatokat 250 ml-es lombikba szűrtük.

#### 4.1.2. HPLC-ESI/MS

A polifenolokat LC/MS módszerrel vizsgáltuk (Agilent 1100 HPLC Series system, USA, UV detector, Agilent 1100 spektrofotométer LC/MSD Ion Trap VL). A kivonáshoz (48 °C) fordított fázisú oszlopot alkalmaztunk (Zorbax SB-C18, 100x3.0 mm i.d., 3,5 µm). A detektálás UV (330 nm és 17,5 perc, majd 370 nm) és MS módban történt. Az MS rendszer ESI és negatív módban működött. A kapott adatokat Chem Station és Data Analysis software (Agilent, USA) segítségével elemeztük. A mozgófázisban metanol és 0,1% ecetsav (v/v) szerepelt.

A 18 tesztvegyület elúciója 35 percig tartott, amelyek a következők: kaftár-, gentizin-, kávé-, klorogén-, *p*-kumár-, ferula- és szinapinsav, továbbá hiperozid, rutin, miricetin, fizetin, kvercitrin, izokvercitrin, kvercetin, patuletin, kempferol, apigenin és luteolin. A  $t_R = 12.5$  plusz jele valószínűleg a *cisz*-ferulasavat jelölte.

#### 4.1.3. HPLC-ESI-MS/MS

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás – tandem tömegspektrometriás vizsgálatokat Agilent 1100 HPLC készülékkel kapcsolt, elektroporlasztásos (ESI) ionforrással szerelt Agilent 6410 hármass kvadrupól



tömegspektrométerrel, negatív ionizációs üzemmódban végeztük. A komponensek kromatográfiás elválasztásához ZORBAX SB-C18 3.0x150 mm 3.5 µm oszlopot használtunk. A mozgófázis 0,3 v/v% ecetsav-víz elegye és metanol, az oszlop hőmérséklete 25 °C volt. A mozgófázis áramlási sebessége 0,3 ml/perc, az injektált mintamennyiség 5 µL volt. ESI körülmények: nitrogén gáz hőmérséklete: 350 °C, porlasztó nyomása: 40 psi (N<sub>2</sub>), szárító gáz áramlási sebessége: 9 L/perc (N<sub>2</sub>), kapillárisfeszültség: 3500 V, fragmentorfeszültség: 100 V; a szerkezeti különbségek miatt az ütközési energiát 10-50 eV között változtattuk. Ütközési gázként magas tisztaságú nitrogént alkalmaztunk. A spektrumokat *m/z* 70-1000 tartományban rögzítettük (1 scan/másodperc) volt. Az analízishez és az értékeléshez Masshunter B.01.03 software-t használtunk. A komponensek azonosításához a retenciós időt, az UV- és tömegspektrumokat, valamint irodalmi adatokat vettünk alapul.

#### **4.1.4. Összpolifenol- és összcserzőanyag-tartalom meghatározása**

A fenti mintákat porítva 15 ml desztillált vízben 30 percig melegítettük. A hűtött kivonatokat 25 ml-re hígítottuk, majd szűrést követően minden kivonat első 50 ml-mennyiségét félretettük.

##### *a. Összpolifenol-tartalom*

A vizsgálat a EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7<sup>th</sup> (2010) módszere alapján készült. A szüredék 5 ml-ét desztillált vízzel 25 ml-re hígítottuk. A hígított oldat 2 ml-ét 1 ml foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10 ml vízzel elegyítettük, majd nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25 ml-re hígítottuk. Az oldat abszorbanciáját 30 perc elteltével Metertech UV/VIS SP8001 spektrofotométeren 760 nm-en mértük; kompenzáló folyadékként vizet használtunk.

##### *b. Bőrporra nem abszorbeálódó polifenolok*

A szüredék 10 ml-ét 0,1 g bőrporral 60 percen át erőteljesen rázattuk, szűrtük, majd a szüredék 5 ml-ét vízzel 25 ml-re hígítottuk. A hígított oldat 2 ml-ét 1 ml foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10 ml vízzel elegyítettük, majd nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25 ml-re hígítottuk. Az oldat abszorbanciáját 30 perc elteltével Metertech UV/VIS SP8001 spektrofotométeren 760 nm-en mértük; kompenzáló folyadékként vizet használtunk.

### c. Összehasonlító oldat

50 mg pirogallolt desztillált vízzel 100 ml-re oldottunk, majd az oldat 5 ml-ét desztillált vízzel 100 ml-re hígítottuk. A hígított oldat 2 ml-ét 1 ml foszfor-molibdén-volfrámsav reagenssel és 10 ml vízzel elegyítettük, majd nátrium-karbonát 290 g/l töménységű oldatával 25 ml-re hígítottuk. Az oldat abszorbanciáját 30 perc elteltével Metertech UV/VIS SP8001 spektrofotométeren 760 nm-en mértük; kompenzáló folyadékként vizet használtunk.

Minden vizsgálatot kétszer végeztünk. A polifenoltartalmat a következő képlettel számoltuk (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7<sup>th</sup> 2010):

*Bőrporra nem abszorbeálódó polifenolok:*  $[62.5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2] / A_3 \cdot m_1$

$m_1$  = vizsgálandó minta tömege grammban

$m_2$  = pirogallol tömege grammban

*Összes polifenol:*  $[62.5 \cdot A_1 \cdot m_2] / A_3 \cdot m_1$

$m_1$  = vizsgálandó minta tömege grammban

$m_2$  = pirogallol tömege grammban.

## 4. 2. Eredmények és megvitatásuk

### 4.2.1. HPLC-ESI/MS

HPLC-ESI/MS módszerrel a bengáli és arab kávé levél, éretlen termésfal és mag kivonatait vizsgáltuk. A bengáli kávéban 9 polifenol-komponenst azonosítottunk, ezek között 5 fenolkarbonsav (kávé-, klorogén-, ferula-, szinapin- és *p*-kumársav) és 4 flavonol (kvercetin, izokvercetin, kempferol, rutin) szerepelt. Fenolkarbonsavakat kimutattunk a levélben, az éretlen termésfalban és magban is, míg flavonolok csak a levélben és a termésfalban voltak jelen.

A bengáli kávé esetében az éretlen mag nem hidrolizált kivonataiban a klorogénsav volt domináns komponens, míg az éretlen termésfalban legkisebb mennyiségben rutin volt jelen. A levél hidrolizált kivonatában kávésav nagy, az éretlen termésfalban kempferol kis mennyiségben szerepelt. Fenolkarbonsavak között kávé- és ferulasavak nagy mennyiségben a levél hidrolizált kivonatában, klorogénsav az éretlen termésfal nem hidrolizált kivonatában, *p*-kumársav az éretlen termésfal hidrolizált kivonatában volt jelen. Mindkét faj levelének nem hidrolizált kivonatában izokvercitrin és rutin, hidrolizált kivonatokban kvercetin és kempferol szerepelt domináns flavonolként. Irodalmi adatok alapján az arab kávé termést hozó és nem termő egyedei között polifenoltartalomban nem találtak eltérést (SALGADO et al.

2008). Az éretlen termésfal alacsony polifenoltartalmának háttérében a növények eltérő életkörülményei állhatnak, amelyet jelen munkánkban nem vizsgáltunk.

A fenti módszerrel vizsgált 2 taxon esetében különbségek figyelhetők meg a klorogén-, ferula-, *p*-kumár- és szinapinsavtartalomban, amelyet a levélben és magban mértünk magasabbnak. Szinapinsav az arab kávé esetében csak a levélkivonatban volt jelen. Flavonolok a bengáli kávé levelében szerepeltek nagyobb mennyiségben az arab kávéhoz viszonyítva.

#### 4.2.2. HPLC-ESI-MS/MS

A vizsgálatok során 25 fenoloid vegyületet határoztunk meg, ebből 22 a bengáli mintában volt jelen a következők szerint: 16 fenolkarbonsav-származék (pl. kaffeoil-kínasavak), 2 flaván-3-ol, 2 procianidin-dimer, 2 procianidin-trimer, egy xantonoid és 2 alifás trikarbonsav.

A növényekben azonosított fenoloid vegyületek összetétele néhány kisebb eltéréstől eltekintve hasonló a vizsgált fajokban. A domináns komponens minden kivonatban a klorogénsav volt. A 4-kaffeoil-kínasav (4-CQA) és 5-kaffeoil-kínasav (5-CQA) minden mintában jelen volt, kivéve a *C. arabica* levél kivonatában. Dikaffeoil-kínasavak (diCQAs) és izocitromsav szintén minden mintában kimutatható volt. A 4,5-diCQA a bengáli kávé éretlen termésfal kivonatát kivéve, míg a 3,4-diCQA a libériai kávé érett termésfalát és a bengáli mintha éretlen termésfalát kivéve jelen volt minden kivonatban. A legtöbb (17) komponens az arab kávé éretlen termésfalában mutattuk ki, ezt követi a bengáli kávé érett termésfala és a libériai kávé levélkivonata (16-16 komponens).

#### *Coffea* fajok levélkivonata

A 3-CQA minden levélkivonatban jelen volt a *C. arabica* domináns komponenseként, míg a *C. benghalensis* és *C. liberica* esetében a 5-CQA a fő komponens. Az 5-kumaroil-kínasav (5-CoQA) és az 5-CQA izomerek előfordulnak a libériai kávéban, míg a 4-CQA, diCQAs, ferulasav és mangiferin minden mintában kimutatható volt. TREVISAN et al. (2016) megfigyelése alapján az össz-mangiferin-tartalom magasabbnak bizonyult azokban a levélkivonatokban, amelyek természetes fény hatására fejlődtek. A szakirodalmi adatokkal ellentétben (CONÉJÉRO et al 2014) 5-kaffeoil-kínasavat nem találtunk a *C. arabica* levelében, míg procianidin-trimerek minden levélmintában megjelentek.

Az eredmények a klorogénsav jelenlétét támasztják alá az arab kávé esetében (KY et al. 2007), amelyet ezen faj mellett a bengáli kávé nem hidrolizált levél- és termésfalkivonataiban az előzőekben ismertetett LC/MS vizsgálatokkal mennyiségi szempontból is meghatároztunk.

#### *Éretlen termésfalkivonatok*

A vizsgált fajok éretlen termésfalában 5-CQA, 4-CQA és katechin/epikatechin voltak jelen domináns komponensként. Az arab és libériai kávé mintáiban 3-CQA, 5-CQA, 4-feruloil-kínasav (4-FQA), 3,4-diCQA, 3,5-diCQA és 4,5-diCQA is kimutatható volt. Bár ferulasav a bengáli mintában alacsony mennyiségben szerepelt, a vizsgálatok alátámasztották a ferulasav előző módszerrel történt mennyiségi meghatározását.

#### *Éretlen magkivonatok*

Fő komponensként az éretlen magvakban 5-CQA szerepelt, amely mellett 4-FQA, 4-CQA és 3-CQA voltak jelen. 5-CoQA és 5-FQA csak az arab és libériai mintákban fordultak elő. A libériai kávé tartalmazott továbbá egy procianidin-dimert és 5-CQA metil-étert is, amely az érett magban is megjelent. A diCQA komponensek jelen voltak a *C. benghalensis* és a *C. arabica* mintákban, míg a *C. liberica* mintából kimutattuk a 3,4-diCQA és 4,5-diCQA jelenlétét is. Előző vizsgálataink alapján a ferulasav mennyisége megegyezett a bengáli kávé éretlen mag és levél nem hidrolizált kivonataiban. A fenolos vegyületek mellett a *C. arabica* éretlen magjában izocitromsavat, kaffeoil-hexozidot és katechint/epikatechint azonosítottunk, míg 5-kaffeoil-kínasav nem volt jelen.

Az eredmények alátámasztják előző vizsgálataink eredményeit, amely szerint a klorogénsavak háromszoros mennyiségben voltak jelen az arab kávé éretlen magjának nem hidrolizált kivonataiban, mint a bengáli kávé mintáiban.

#### *Érett termésfalkivonatok*

Az éretlen mag kivonataihoz hasonlóan a fő komponens a 5-CQA, míg a 4-CQA a legkisebb mennyiségben fordult elő. A bengáli és arab kávé mintái 3-CQA, 5-CQA, 5-CoQA, 4-FQA és diCQA komponenseket is tartalmaztak, míg a libériai kávéban előfordult továbbá 4,5-diCQA, a bengáli kávéban flavan-3-ol és procianidin.

### *Érett magkivonatok*

A bengáli és arab kávé esetében 5-CQA szerepelt domináns komponensként, míg a 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA és diCQAs kisebb mennyiségben voltak jelen. A bengáli kávéban 5-FQA-at is detektáltunk, a 5-CQA és 4-CQA izomerek mennyisége alacsonyabb volt a libériai kávéban. Szintén kisebb mennyiségben fordult elő a mintákban a 3-CQA, 5-CoQA, 4-FQA és diCQAs. Citromsavat kizárólag a *C. liberica* éretlen magja tartalmazott. KY et al. (2007) és CAMPA et al. (2005) korábban már kimutattott klorogénsavat a libériai mintában, amely megerősíti eredményeinket. ASCENSION et al. (2004) vizsgálatai katechinek, epikatechinek, flavonolok, antocianidinek, flavan-3-olok és hidroxifahéjsavak (pl. kaffeoil-kínasav) és származékaik, valamint *p*-kumaroil-kínasav tekintetében támasztják alá vizsgálataink eredményeit, hangsúlyozva az epikatechin jelenlétét az arab kávéban (mennyisége meghaladta a proantocianidinek 90%-át).

#### **4.2.3. Összpolifenol- és összceszőanyag-tartalom**

A legjelentősebb csezőanyagtartalmat az arab kávé levelében mértük, amelyet a bengáli faj éretlen termésfala és a libériai minta levélkivonata követ. A vizsgált komponensek legkisebb mennyiségben a növények érett magkivonataiban és a libériai kávé éretlen termésfalában fordultak elő.

A legmagasabb polifenoltartalom a növények leveleiben (legmagasabb érték: arab kávé) és érett magvaiban, míg a legalacsonyabb a libériai kávé érett termésfalában volt megfigyelhető. Magvak tekintetében a bengáli kávé éretlen magkivonata több csezőanyagot tartalmazott, mint polifenolt.

Eredményeink megerősítik előző vizsgálatainkat, amely szerint a bengáli kávé érett magkivonata igen alacsony mennyiségben tartalmazott csezőanyagot, míg polifenoltartalma magasabb volt az arab és libériai minták érett magkivonatához képest.

Szakirodalmi adatok alapján (NAIDU et al. 2008) az összpolifenoltartalom és antioxidáns hatás magasabb volt az arab kávé azon éretlen magvaiban, amelyeknél a kivonás izopropanol és víz (60:40) segítségével történt. Az arab kávé érett termésfala esetében az összceszőanyagtartalom magasabb volt a bengáli kávé mért értékénél, míg ezutóbbi rendelkezett a legmagasabb polifenoltartalommal.

## **5. Coffea fajok antioxidáns hatásának vizsgálata**

### **5.1. Anyagok és módszerek**

#### **5.1.1. Mintaelőkészítés**

Az antioxidáns hatás vizsgálatához a *C. arabica*, *C. benghalensis*, és *C. liberica* mintákat a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjéből gyűjtöttük 2014 és 2015 tavaszán (fajonként 2 egyedről). A 3 alkalmazott módszerhez (ECL, DPPH, ORAC) az éretlen és érett termésfalat és magot porítottuk (0,25 g/minta), majd a kivonás 5 ml 50% etanollal történt. A kivonatokat 20 percig rázattuk (KL-2, Edmund Bühler GmbH, Germany), szűrtük, majd 4 °C-on sötétben tároltuk a vizsgálatok kezdetéig (kevesebb mint 7 nap). A lomblevelek antioxidáns aktivitását nem vizsgáltuk, mivel klorofilltartalmuk miatt a kivonatok optikailag inhomogének voltak. Az antioxidáns teszteléseket a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetében végeztük.

#### **5.1.2. 2,2-difenil-1-pikrazilhidrazil (DPPH) módszer**

A módszer során 4 mg DPPH-t 100 ml metanollal (0,1 mmol/l) elegyítettünk, az oldat 1 hétig hűtőben tárolva stabilnak bizonyult. Az antioxidáns kapacitás mérésekhez standard 96-lyukú microplate-et (Sarstedt) használtunk. A lyukakba 20 µl Trolox standardot/vakot/mintát és 180 µl DPPH oldatot pipettáztunk, majd 30 perces, 25 °C-on sötétben történő inkubálás után az abszorbanciát 517 nm-en vizsgáltuk.

#### **5.1.3. Enhanced chemiluminescence (ECL) módszer**

*Reagensek:* A vizsgálatokhoz 15 µU/ml POD oldatot frissen készítettünk 1mg/ml BSA-t tartalmazó foszfát pufferben (PBS, pH=7,4) hígítva és azt a mérésekig jégen tartottuk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> használati reagens (1360 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) szintén közvetlenül a vizsgálatok előtt készült (10 M koncentrált oldatot 0,1 % citromsavval hígítottunk), amelyet fénytől védve jégen tároltunk a vizsgálat teljes ideje alatt a stabilitás megőrzése céljából. Az erősített kemilumineszcenciás (ECL) reagenst külön állítottuk elő luminol és *p*-iodofenol 0,2 M bórsav/NaOH pufferrel való hígításával (pH=9,6). Ezt 4 °C-on, sötét üvegben tároltuk. Standardként Troloxot használtuk: 1 mM Troloxot 50% etanolban oldottunk, majd 4 °C-on tároltuk. A vizsgálatoktól függően a Trolox oldatot a vizsgálat napján 0-100 µM tartományba hígítottuk ugyanazzal a diluenssel, amelyet a mintákhoz is használtunk.

*ECL antioxidáns módszer:* A kemilumineszcens reakciót 96-lyukú fehér optikai lemez (Perkin-Elmer) segítségével végeztük. A használati enzim

munkaoldatot az ECL reagenssel elegyítettük (200  $\mu\text{L}$  POD + 70  $\mu\text{L}$  ECL reagens) és jégen tartottuk. A lemezen található lyukakba 20  $\mu\text{L}$  Troloxot/vakot/mintát és 270  $\mu\text{L}$  POD-ECL reagenst adtunk 8 csatornás mikropipettával. A reakció automatikusan indult 20  $\mu\text{L}$  hideg használati  $\text{H}_2\text{O}_2$  injektálásával (végleges koncentráció a lyukakban: 0,97  $\mu\text{U/ml}$  POD, 101,6  $\mu\text{M}$  luminol, 406,4  $\mu\text{M}$  *p*-iodofenol, 88  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A kemilumineszcenciás jel intenzitását 20 percig követtük.

#### **5.1.4. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) módszer**

A vizsgálathoz használt 4  $\mu\text{M}$  fluoreszcint (FL) 75 mM foszfát pufferrel állítottuk elő (pH=7,4), amely hűtőben tárolva egy hétig stabil. A használati FL oldatot közvetlenül a vizsgálat előtt készítettük el 1:99 arányú hígítással (40 nmol/l FL foszfát pufferben). Az AAPH előállítás is foszfát pufferrel történt (400 mM). Standardként szintén Troloxot használtunk. A fekete optikai lemezekben található lyukakba (Perkin Elmer) 25  $\mu\text{L}$  vak/standard/minta és 150  $\mu\text{L}$  használati FL került, ezután a lemezeket előmelegítettük 37 °C-ra 20 percen át, sötétben. A lemezek külső lyukaiba 200  $\mu\text{L}$  foszfát puffert adtunk, így a lyukak 6x10-es mátrixát alkalmaztuk a vizsgálatok során a jobb hőmérséklet tartása érdekében. A vizsgálat automatikusan a 25  $\mu\text{L}$  AAPH injektálásával indult, majd a fluoreszcenciát 80 percen át követtük (490/520 nm) 150 másodperces intervallumokban. A végleges koncentráció a lyukakban: FL 30 nM, AAPH 50 mM, Trolox 0-33,3  $\mu\text{M}$ .

#### **5.1.5. Antioxidáns módszerek műszeres háttere és az adatok értelmezése**

Az ECL vizsgálatokhoz Biotek Synergy HT programozható injektorral ellátott lemezolvasó készüléket alkalmaztunk. A vizsgálat kezdetekor, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  injektálása után a fény detektálása azonnal kezdetét vette 0,2 másodperces mérési idővel lyukanként, ami 20 percig tartott 64 másodperces mérési intervallumokban. A Trolox standardot 50% etanollal hígítva alkalmaztuk, amelynek végleges koncentrációja lyukanként 0-15  $\mu\text{M}$  tartományban mozgott. A mérésekhez 50% etanolból 32x hígítást készítettünk (n = 12 ismétlés/minta). A TAC (Total Antioxidant Capacity) értékeket a standardokra kapott regressziós egyenes egyenletéből számoltuk ki, amelyet megszoroztunk a hígítási tényezővel és  $\mu\text{M}$  Trolox-ekvivalensben adtunk meg (TE). A TE értéket minden minta esetében 1 g száraz drogra vonatkoztattuk.

A DPPH vizsgálatokhoz Perkin Elmer EnSpire Multimode olvasót használtunk abszorbancia módban és monokromátorokkal ellátva. A Trolox standardot 50% etanollal használtuk, amelynek végleges koncentrációja lyukanként 0-25  $\mu\text{M}$  tartományban mozgott. Az abszorbancia értékeket 517 nm-en olvastuk le 30 perces, 25 °C-on való inkubálás után (5 másodperces rázásokkal a mérések előtt). Az antioxidáns kapacitást a standardokra kapott kalibrációs egyenes egyenletével számoltuk ki, illetve meghatároztuk a minták antioxidáns kapacitását az abszorbancia csökkenést %-ban kifejezve. Ehhez a következő képletet használtuk:  $(A_{\text{vak}} - A_{\text{minta}}/A_{\text{vak}}) \times 100$ . A TAC értékek itt is 1 g száraz drogra vonatkoztak és TE/g vagy % TAC/g-ként adtuk meg.

Az ORAC vizsgálatokhoz Biotek Synergy HT plate readert alkalmaztunk fluoreszcens módban 37 °C-on 490 nm-es gerjesztési és 520 nm-es emissziós szűrő beállításokkal. A lemezek 20 perces előmelegítése után a 37 °C-ra temperált készülékben az AAPH start reagenst automatikusan injektáltuk a lyukakba. A mérések 80 percig tartottak 150 másodpercenkénti mintavétellel, 100 gerjesztő impulzus/lyuk detektálási módot alkalmazva mindegyik mérési pontban. A TE számítása során a megfelelő vakpróbák értékeinek fluoreszcens intenzitásait levontuk a Trolox-standard értékéből (nettó görbe alatti terület, nAUC), így egy kalibrációs egyenest kaptunk a nAUC vs. Trolox koncentráció alapján. A vizsgált minták TE értékét a standardok regressziós egyenletéből számoltuk 1 g száraz drogra vonatkoztatva.

## 5. 2. Eredmények és megvitatásuk

A vizsgált kávéminták esetében antioxidáns hatás kimutatható volt az alkalmazott 3 módszer segítségével. Az ECL és DPPH TE/g értékek laza összefüggést mutattak ( $R^2=0,587$ ,  $p=0,083$  Student t-próbával), míg az ORAC vizsgálatok eredményei szignifikánsan magasabbak voltak. Az ORAC eredmények nem korreláltak a másik két módszer eredményeivel. A vizsgálatok pontatlansága elfogadható volt (ECL:  $\leq 5\%$ , DPPH:  $\leq 10\%$ , ORAC:  $\leq 2\%$ , variációs koefficiensben kifejezve). A DPPH adatokat % TAC-ban is kiszámítottuk (ld. 2.8 pont). Az ECL és DPPH % vizsgálatok során kapott antioxidáns értékei között szorosabb összefüggést tapasztaltunk ( $R^2=0,6107$ ,  $p=0,161$  Student t-próba).

A legnagyobb eltérést a bengáli kávé éretlen és a libériai kávé érett termésfala esetében mért antioxidáns értékek között mértük; a DPPH módszer itt magasabb antioxidáns kapacitást jelzett, mint az ECL módszer. Korábbi



irodalmi adatokkal ellentétben (KIRAN et al. 2011) vizsgálataink során alacsonyabb antioxidáns kapacitást figyeltünk meg a bengáli kávé érett terméskivonatainál, míg ez az érték magasabb volt a növény éretlen termésfala esetében DPPH módszer alkalmazásával. Az alacsony  $R^2$  értékek magyarázata az alkalmazott módszerekben keresendő, amelyek eltérő gyököket és gyök-semlegesítést eredményeztek. További ok lehet az alkalmazott detektor molekulák és antioxidánsok különbözősége.

Összességében a vizsgált minták között a libériai kávé érett termésfalának antioxidáns kapacitása volt a legjelentősebb. Bár ez a faj az élelmiszeriparban kevésbé alkalmazott, az éretlen magok antioxidáns hatása vetekszik az arab és robuszta kávé értékeivel (utóbbi általunk nem vizsgált faj esetében: irodalmi adatok alapján).

## **6. Coffea fajok antimikrobás hatásának vizsgálata**

### **6. 1. Anyagok és módszerek**

#### **6.1.1. Mintaelőkészítés**

A 3 kávéfaj levél, éretlen és érett mag és termés mintákat a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjéből gyűjtöttük 2014 és 2015 tavaszán (fajonként 2 egyedről). Mintánként 0,5 g-ot porítottunk, 5-5 ml 50% etanolt hozzáadva melegítettük ultrahangos vízfürdön (Elmasonic S 30, Simex, 20 perc, 40°C), majd szűrtük. A vizsgálatokat a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében végeztük.

#### **6.1.2. Korong- és agardiffúziós módszer**

A táptalajhoz 1 ml desztillált víz és 38 g Mueller-Hinton agart főztünk 30 percig, majd 25-25 ml-t Petri-csészékbe öntöttünk. A korongdiffúziós módszer során 48 Petri-csészét hűtőben tároltunk, míg a táptalaj megszilárdult. A baktériumtörzseket 1,5 ml NaCl 0,9% oldatában szuszpendáltuk, táptalajon szélesztettük, felszínükre 5 mm átmérőjű papírkorongokat helyeztünk, amelyekre a kivonatok és a tesztvegyületek kerültek (10-10  $\mu$ l). Az agardiffúziós módszerhez 100-100  $\mu$ l kivonatot mértünk a táptalajban előkészített lyukakba. Korongdiffúzióval mindhárom faj esetében a levél, mag és termésfal kivonatait, míg agardiffúzióval csak a levelet vizsgáltuk a következő Gram-pozitív baktériumtörzsek ellen: *MRSA* (fertőző beteg hemokultúrájából izolálva), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) és *Streptococcus agalactiae* törzsek (hüvelyváladékból

izolálva). A *S. aureus* és *B. subtilis* törzsek nemzetközi törzsgyűjteményekből, míg az *MRSA* és *S. agalactie* a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet Rutin Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában klinikai mintákból származnak. Standard antibiotikumként 5 µg/ml vankomicint használtunk. A Petri-csészéket 37 °C-on 48 órán át állni hagytuk, majd a gátlási zónákat mértük (mm). A vizsgálatokat háromszor ismételtük.

## 6. 2. Eredmények és megvitatásuk

### 6.2.1. Korongdiffúziós módszer

Eredményeink alapján az arab kávé levélkivonata mutatta a legnagyobb, míg a libériai kávé érett magkivonata a legkisebb gátlást a vizsgált törzsek ellen. A legkisebb gátló hatást a libériai kávé éretlen terméscsoma és érett magva, valamint a bengáli kávé érett magkivonata mutatta (ezutóbbi *S. agalactie* és *B. subtilis* ellen).

A bengáli kávé esetében kapott eredmények összhangban állnak KIRAN et al. 2011 és KIRAN et al. 2012 adataival, ahol a szerzők a növény *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* és *Staphylococcus aureus* elleni aktivitását mutatták ki. Az adatokat vizsgálatainkban a levél és éretlen termések antimikrobás eredményeivel egészítettük ki.

*MRSA* ellen a vizsgált minták között az arab kávé kivonata bizonyult leghatásosabbnak, míg a bengáli kávé érett terméscsoma a legkisebb gátlási zónát eredményezte. A *B. subtilis* esetében minden vizsgált kivonat gátló hatást mutatott, amelyek között az arab és bengáli kávé levélkivonatai bizonyultak leghatékonyabbnak. A *S. agalactie* ellen az arab kávé levélkivonata mutatta a legerősebb, míg a libériai kávé éretlen terméscsoma a legkisebb gátló hatást.

### 6.2.2. Agardiffúziós módszer

A növények levélkivonatainak eredményei alátámasztják a korongdiffúziós módszerrel kapott adatokat. A módszerrel a legérzékenyebb az *MRSA* és *B. subtilis* volt – amelyeknél a *C. arabica* és *C. benghalensis* levélkivonatai mutatták a legerősebb gátlást –, míg legkevésbé a *S. agalactie* törzs volt érzékeny.

Az irodalmi adatok szerint az arab kávé pörkölt magvai gátló hatást fejtenek ki *B. subtilis* ellen és *S. aureus* ellen (DAGLIA et al. 1994), amely a magas klorogénsavtartalomnak és a Maillard reakció során (magpörköléskor) keletkező termékeknek köszönhető. Vizsgálatainkban mindhárom faj

levélkivonata gátló hatást mutatott a fenti módszerrel a két törzs ellen. A klorogénsavak, amelyeket minden vizsgált kivonatban kimutattunk HPLC-ESI-MS/MS módszerrel, korábbi irodalmi adatokhoz (LOU et al. 2011, DAGLIA et al. 1994) hasonlóan alátámasztják az arab kávé magvaiban előforduló fenolkarbonsavak antibakteriális hatását.

## 7. Új eredmények összefoglalása

A kitűzött célok alapján a *Coffea arabica*, *C. liberica* és *C. benghalensis* hisztológiai, fitokémiai és antimikrobás hatásának összehasonlító vizsgálatával kiemeljük a bengáli kávé jelentőségét. Az elvégzett vizsgálatok alapján munkánk új eredményei a következők:

- Szöveti eredmények: a *C. benghalensis* levelei vastagabb kutikulával és 2 sorban elhelyezkedő, magasabb oszlopos alapszöveti sejtekkel jellemezhetők. A faj levélnyelében és szárában magasabb epidermiszsejteket, termésében szélesebb és magasabb alapszöveti sejteket figyeltünk meg a *C. arabica* és a *C. liberica* adataival szemben.
- Fitokémiai eredmények: a vizsgált fajok levelében, az érett és éretlen terméshalban és magban 34 fenolos komponenst mutattunk ki HPLC módszerrel. A bengáli kávé éretlen terméshalában mutattuk ki a legmagasabb cserzőanyag- és polifenoltartalmat az arab kávé magas adatai mellett, továbbá a bengáli kávé érett terméshal- és magkivonata is magas polifenoltartalommal rendelkezett.
- Az antioxidáns hatás vizsgálata alapján a vizsgált minták ORAC módszerrel mutatták a legnagyobb antioxidáns értékeket, amely azonban nem egyezett a DPPH és ECL módszerek eredményeivel. A bengáli kávé éretlen magva és terméshala (DPPH módszerrel), valamint az érett terméshal (ORAC) kivonata rendelkezett a legnagyobb antioxidáns aktivitással. Az ECL vizsgálatok során a libériai kávé kivonatai rendelkeztek a legnagyobb értékekkel.
- Az antimikrobás vizsgálatok során a 3 kávéfaj levél, éretlen és érett mag, valamint a terméshal kivonatainak hatását vizsgáltuk *MRSA*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae* és *Staphylococcus aureus* törzseken agardiffúziós és korongdiffúziós módszerrel. A bengáli kávé kivonatai hatásosnak bizonyultak a vizsgált törzsek ellen. Habár legerősebb antibakteriális hatást a bengáli és arab kávé levélkivonata mutatta a *B. subtilis* ellen, vizsgálataink alátámasztják a bengáli kávé antimikrobás aktivitását az arab és libériai kávé pozitív eredményei mellett.

Eredményeink új tudományos adatokat szolgáltatnak a *C. benghalensis*, mint vadon élő és kevésbé tanulmányozott kávéfaj szövettani és fitokémiai jellemzőit, valamint antioxidáns és antimikrobás hatását tekintve, amely új lehetőségeket és kihívásokat jelenthet a faj esetleges további fitokémiai és farmakológiai vizsgálata során.

## **8. Köszönet**

Elsőként témavezetőmnek, dr. Papp Nórának szeretnék köszönetet mondani, aki elvállalta PhD témám vezetését a PTE GYTK Farmakognóziái Intézetben. Szeretném megköszönni, hogy elismert csapatába fogadott és lehetőséget biztosított, hogy tudományos munkám az intézet laboratóriumában elvégezhessem. Biztatása, folyamatos támogatása és ösztönzése nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Németh Tibornak (Nagyvárad), aki a tudomány rögös útján elindított, és segítségével megismerhettem témavezetőm. Támogatásával és tanácsaival végig ösztönözött munkám során.

Köszönetet szeretnék mondani a szövettani és fitokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségéért dr. Bencsik Tímeának, Balázs Viktória Lillának, Filep Ritának (PTE GYTK Farmakognóziái Intézet), dr. Alberti Ágnesnek és dr. Csernák Orsolyának (Simmelweis Egyetem GYTK Farmakognóziái Intézet), Csepregi Ritának (PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet), Prof. dr. Németh Tibornak, dr. Németh Sebastiannak (Nagyvárad Egyetem Orvosi és Gyógyszertudományi Kar Farmakognózia Tanszék), és dr. Vlase Lauriannak (Iuliu Hatieganu Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet, Kolozsvár). Az antioxidáns vizsgálatokban Prof. Dr. Kőszegi Tamás és Sali Nikolett (PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet), a mikrobiológiai vizsgálatokban dr. Kocsis Béláné Erika és dr. Kocsis Béla (PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet) nyújtott segítséget.

Hálás vagyok továbbá tanárainak, kollégáimnak és barátaimnak PTE GYTK Farmakognózia Intézetében, akik tanácsaikkal és barátságos hangulattal feleltették velem a tudományos munka nehézségeit és ösztönöztek folytatásra.

Tudományos munkám megvalósítását a TÁMOP 4.2.3, Domus Szülőföldi Junior Ösztöndíj 2014, Domus Magyarországi Junior Ösztöndíj 2014, Domus Magyarországi Junior Ösztöndíj 2015 és Campus Hungary pályázatok segítették.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom férjemnek, Patay János Istvánnak, aki folyamatos támogatásával és optimista gondolkodásával segítette át a nehéz pillanatokon. Szeretném megköszönni továbbá családomnak is a támogatást, segítségük nélkül disszertációm szintén nem jöhetett volna létre.

## 9. Publikációk, poszterprezentációk és előadások jegyzéke

### Publikációk:

1. **Eva Brigitta Patay**, Fritea Luminita, Andreea Antonescu, Angela Antonescu, Luciana Dobjanschi (2017): Caffeine Research: *Coffea arabica* - a plant with rich content in caffeine. The Question of Caffeine. Chapter II. *RIJEKA: INTECH OPEN ACCESS PUBLISHER*, pp. 27-44, ISBN: 978-953-51-3274-5.
2. **Éva Brigitta Patay**, Nikolett Sali, Tamás Kőszegi, Rita Csepregi, Viktória Lilla Balázs, Tibor Sebastian Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2016): Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE* 9(4): 366-371. (IF=0.925)
3. **Éva Brigitta Patay**, Tímea Bencsik, Nóra Papp (2016): Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE* 9(12): 1127-1135. (IF=0.925)
4. **Patay Éva Brigitta**, Nemeth Tibor, Nemeth T Sebastian, Filep Rita, Vlase Laurian, Papp Nóra (2016): Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne ex. Schult., compared with *Coffea arabica* L. *FARMACIA (BUCHAREST)* 64(1): 125-130. (IF=1.348)
5. **Éva Brigitta Patay**, T Sebastian Nemeth, Tibor Nemeth, Laurian Vlase (2014): Cercetări fitochimice asupra pericarpului speciei *Coffea arabica* L. *PRACTICA FARMACEUTICA/ROMANIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL PRACTICE* 7(1): 12-14.
6. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor Sebastian, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok biológiai, fitokémiai és gyógyászati értékelése. *BOTANIKAI KÖZLEMÉNYEK* 101(1-2): 263-280.
7. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Németh Sebastian, Papp Nóra (2014): Szövettani vizsgálatok *Coffea arabica* L. és *Psilanthus benghalensis* Roxb. levélen és levélnyélen. *GYÓGYSZERÉSZET* 58: 88.

### Poszterprezentációk:

8. **Éva Brigitta Patay**, T S Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2014): Szövettani vizsgálatok *Coffea arabica* L. és *Psilanthus benghalensis* Roxb. levélen és levélnyélen. XVth Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2014. április 10-12.

9. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Németh T Sebastian, Papp Nóra (2014): Historical ethnobotany and antimicrobial effect of some *Coffea* species. 6th ICEB Congress, Córdoba, Spanyolország, 2014. november 17-21. Abstract Book: 321-322.
10. **Patay Éva Brigitta**, Nemeth Tibor Sebastian, Nemeth Tibor, Papp Nóra, Vlase Laurian (2014): Klorogénsavtartalom vizsgálata *Coffea arabica* L. egyes részeiben. XX. Nemzetközi Vegyészkonferencia. Kolozsvár, Románia, 2014. november 6-9. Abstract Book: 119.
11. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): Study of polyphenol content in seed and pericarp of two *Coffea* species. X. Szentágotthai János Transzdiszciplináris Konferencia és Hallgatói Verseny, Pécs, 2013. november 4-5. Absztraktkötet: 69.
12. **Bagosi Éva Brigitta**, Papp Nóra, Németh Tibor (2012): A *Coffeae folium* hisztológiai vizsgálata. XIV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Pécs, 2012. szeptember 28. Absztraktkötet: 41-42.

#### Előadások:

13. **Éva Brigitta Patay**, Nikolett Sali, Tamás Kőszegi, Sebastian T Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2015): Cercetări fitochimice asupra efectului antioxidant al speciilor de *Coffea*. Simpozion: Actualități în fitoterapie, Cséfa, Romania, 2015. július 4.
14. Papp Nora, Balázs Viktoria Lilla, Bartha Samuel Gergely, Bencsik Timea, Dénes Tunde, Filep Rita, Gyergyák Kinga, **Patay Éva Brigitta**, Joós-Békésiné Kallenberger Helena, Tóth Monika, Farkas Ágnes (2017): Gyógynövények hisztológiai értékelése - oktatás és kutatás a pécsi Farmakognózi Intézetben. XV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Budapest, 2017. szeptember 7., Összefoglalók: 12.
15. **Patay Éva**, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok mikrobiológiai vizsgálata Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 267. Szakülése, Pécs, 2014. november 13.
16. **Patay Éva Brigitta**, Nemeth Tibor, Nemeth T Sebastian, Papp Nóra (2014): Microbiological studies of some *Coffea* species. 13th Zilele FMF Oradea Nagyvárad, Románia, 2014. december 13. Abstract Book: 64-66.

17. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok összehasonlító hisztológiai és fitokémiai értékelése. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája. Budakalász, Budakalász, 2014. február 14., Összefoglalók: 14.
18. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): Gondolatok a kávéról - kicsit másképp. Dombóvári Herbárium előadássorozata, Dombóvár, 2014. április 4.
19. **Éva Bagosi**, Nóra Papp, Tibor Németh (2013): Determinarea acidului cafeic din *Coffeae pericarpium* prin metoda HPLC. Zilele farmaceutice Orădene, Băile Felix, Romania, 2013. május 17-18.
20. **Patay Éva**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): Cercetări fitochimice asupra diferitelor specii de *Coffeae semen* și *Coffeae pericarpium*. Principii și aplicații Szimpózium, Nagyvárad. 2013. 09. 13-14
21. **Patay Éva**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): *Coffea* fajok fenoloidjainak vizsgálata HPLC-vel. Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 258. Szakülése, Pécs, 2013. november 7.
22. **Éva Brigitta Bagosi**, Sebastian Németh, Laurian Vlase, Tibor Németh (2012): Cercetări fitochimice asupra *Coffeae folium*. Zilele Farmaceutice Oradene: Impactul Stiintelor Farmaceutice în Asistenta de Sanate: Ediția a VI-a, Oradea, România, Editura Universitatea din Oradea, 2012, Abstract Book: 9-12.
23. Ioana Dohotar, **Éva Brigitta Bagosi**, Luminița Fritea, Diana Fritea, Fawzi Tifur (2011): Consumul Drogurilor în rândul tinerilor. Din preocupările profesorilor. Nagyvárad, Editura Aureo, 2011, Abstract Book: 126-132.



Ph.D. thesis

**Histological, phytochemical and antimicrobial evaluation of  
*Coffea* species**

**Éva Brigitta Patay**

Supervisor:  
dr. Nóra Papp PhD

Program leader:  
dr. József Deli  
doctor of HAS, full professor

Head of the Doctoral School:  
dr. Erika Pintér  
full professor



Department of Pharmacognosy  
Faculty of Pharmacy  
University of Pécs, Hungary  
Pécs, 2017.

## 1. Introduction

*Coffea* species are well-known and widespread all over the world. They have an important role in science because of their pharmacological role. They provide one of the most sought products after petrol on the international market, and they also provide an income for more than 20 million families in more than 50 countries every year. In addition, coffee is one of the most widely consumed beverages worldwide with an annual consumption rate of approximately 7 million tons according to Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) (BAEZA et al. 2014).

Due to their significant caffeine and polyphenol content, *Coffea* extracts possess numerous physiological effects like activity on the central nervous system, as well as antioxidant, anticancer, gastrointestinal, cardiovascular, antibacterial, and dermatological effects. However, there are many previously reported scientific data about these beneficial effects for human body, an inadequate utilization of coffee can cause serious secondary effects.

However, the most famous species are *Coffea arabica* L., *C. robusta* L. Linden and *C. liberica* Hiern., we can also find scientific data on wild coffee species and subspecies cultivated in almost all continents, but these data are insufficient in the recent literature.

## 2. Aims of the study

According to the previously mentioned great impact of coffee on scientific and social field, the specific aims of this study were the followings:

- to realise a comparative histological, phytochemical and antimicrobial analysis of three *Coffea* species: the well know *C. arabica* and *C. liberica*, and a less studied wild species namely *C. benghalensis* B. Heyne ex Schult. as the followings:
- to observe, compare and measure the histological parameters of the leaf, the petiole, and the fruit of the selected *Coffea* species
- to investigate the phytochemical variations, to identify and quantify some polyphenolic compounds of the leaf, the immature and mature fruit of the selected coffees by HPLC methods
- to compare the polyphenol, tannin and total flavonoid content of the leaf and fruit of the selected coffees
- to investigate the antioxidant activity of the pericarp and seed of the selected *Coffea* species by Enhanced Chemiluminescence (ECL), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays
- to prove the antimicrobial effects of each coffee extract with disc and agar diffusion against various microorganisms

- finally, to complement the insufficient scientific data of *C. benghalensis* in the mentioned aspects, to emphasize its importance and to find new sources of natural antioxidants for nutraceuticals, as well as new utilization of wasted residues of coffee products.

### **3. Histological study of the selected *Coffea* species**

#### **3.1. Materials and methods**

##### **3.1.1. Sample preparation**

The stem, leaf, petiole, and immature fruits of *C. arabica*, *C. benghalensis*, and *C. liberica* were collected in the Botanical Garden, University of Pécs in the spring of 2014 and 2015 (Pécs: 193 m altitude above the sea level, 46°04'59" N and 18°13'59" E). According to the documentation of the garden, *C. arabica* was ordered from Konstanz, Germany in 2008 (plantage into the garden: 02/26/2009), *C. liberica* from Giessen, Germany in 2011 (plantage: 04/17/2012), while in the case of *C. benghalensis* there are data only about the age of the plant (~10 years old). The plants are outside in summer but in winter in greenhouse at 12-15 °C and 40-60% humidity. Voucher specimens of each species were deposited and labelled with unique codes. The studies were carried out at the Department of Pharmacognosy, University of Pécs.

Samples were collected from 2 plants per each species: 10 leaves were air-dried at room temperature in shade for leaf clearing method, and 10 other ones were fixed in a mixture of 96% ethanol:glycerine:water (1:1:1) for the histological preparation. Altogether 10-10 stems, petioles and fruits were also fixed in this mixture for microscopical preparation of each species.

##### **3.1.2. Leaf clearing method**

For leaf clearing method the dried leaf samples were cut into 1x1 cm pieces (20 pieces/plant). Firstly they were boiled with 15 mL distilled water, 10% ethanol:KOH (15 mL; 7:3, for 3-4 min), and 4 mL 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 min), then they were kept without boiling in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min). After this, samples were washed with distilled water and boiled with 96% ethanol until total decoloration. The samples were washed again with distilled water, and then the colorless pieces were placed onto slides. 10 pieces/species were left as unstained preparations, and 10 ones were stained with 2-3 drops of 0.02% toluidine blue placed with eye-dropper onto the surface of the pieces (5 min). Finally, they were covered with 2-3 drops of Neo-Mount and cover glass. The stained and unstained slides were studied by Nikon Eclipse 80i microscope and SPOT BASIC v4.0 program.

### **3.1.3. Embedding and preparation of the studied plant parts**

The fixed stem, leaf, petiole, immature and mature fruit of each species were dehydrated in acetone series (70% and 90% acetone for 1 hour each, 100% acetone overnight), and in xylol for 2 hours. Samples were embedded in synthetic resin (Technovit 7100) to perform a solid sample-holder block for further section. 10 µm-thick cross sections were prepared from each sample, and longitudinal sections from all fruits by rotary microtome (Anglia Scientific 0325). Each sample was placed onto slides and dried at 50°C for 2 hours (exsiccator: Memmert Basic UNB200, 32 L). After this, they were stained with 0.02% toluidine blue (5 min), stored in distilled water for some seconds, and then they were soaked in 96% ethanol (2x5 min), isopropanol (2 min) and xylol (2x10 min), and finally they were covered with Neomount and cover glass.

Histological features were studied by Nikon Eclipse 80i microscope and SPOT BASIC v4.0, and the micromorphological characters were measured by Image Tool 3.00 and Image J programs (20 measurements per plant part of each species). The measured parameters were the following: thickness of cuticle, height of epidermis, palisade and spongy parenchyma cells, and width of vascular bundle in the leaf and the petiole (µm).

### **3.1.4. Statistical analysis**

The micromorphometric data were compared with One-way ANOVA with Tukey's pairwise comparisons. If the normality assumption was violated, we applied Kruskal–Wallis test with Mann–Whitney pairwise comparisons. The normality of data series was checked by using Shapiro-Wilk test. All statistics of data were calculated with Past statistic software, version 2.17b.

## **3. 2. Results and discussion**

### **3.2.1. Characters of cleared leaves**

The venation type was different in the cleared leaf samples of the studied coffees. The leaves of *C. arabica* can be characterized by thick main vascular bundles without small branches among the veins. Those of *C. benghalensis* have short branches, while long branches can be observed anastomised with each other in *C. liberica*. The bean-shaped guard cells of the stomata are surrounded by 3 subsidiary cells in each species (anisocytic stoma).

### **3.2.2. Histological features on preparations**

#### **3.2.2.1. Histology of the leaves**

The leaf structure of the selected *Coffea* species was similar including some different markers. It is covered by a thin cuticle on the one-cell-layer epidermis of both adaxial and abaxial surfaces in each species from which the one-cell-layer

epidermis of Arabic coffee was reported earlier. However, the height of both abaxial (26.55  $\mu\text{m}$ ) and adaxial (27.18  $\mu\text{m}$ ) cells were higher in Arabic coffee, the width of these cells (36.67 and 32.66  $\mu\text{m}$ ) was larger in Liberian coffee compared to the other species.

Even though the proportions of the epidermal cells of Bengal coffee were not significant, this plant had the thickest cuticle (8.61 and 8.69  $\mu\text{m}$ ) among the studied species.

The dorsiventral leaves have heterogenous mesophyll in each plant, which include elongated palisade cells towards the adaxial part and isodiametric spongy parenchyma cells to the abaxial leaf surface. Palisade cells, which contain chloroplasts forming chlorenchyma, extend in a single cell row in Arabic and Liberian species, while they can be found in 2 rows in Bengal coffee. The measured parameters of the leaf of Arabic coffee were different compared to an earlier study (FILHO 2006): the height of the adaxial and abaxial cuticle (5.06 and 3.57  $\mu\text{m}$ ) and the epidermis cells (26.55 and 27.18  $\mu\text{m}$ ) were higher but those of the palisade and spongy parenchyma (30.00 and 31.25  $\mu\text{m}$ ) were smaller in our investigation. Among reasons, different techniques and various environmental conditions of the samples can be presumably mentioned.

In each species, several intercellular spaces and Ca-oxalate rosette crystals can be found among the spongy cells. However, the height and width of palisade cells (52.77 and 13.88  $\mu\text{m}$ ) of Bengal coffee were higher than those of the other two species, Arabic coffee had the biggest spongy cells (31.25 and 38.20  $\mu\text{m}$ ), while Bengal coffee had the widest bundles (267.93  $\mu\text{m}$ ). Stomata are located in mesomorphic position at the same level with the abaxial epidermis cells in each species. The vascular bundles of each plant consist of phloem and xylem elements composing a collateral closed structure without cambium. At the upper part of the phloem elements of the central veins, sclerenchyma cells surround the bundles in the middle of the leaves in all species.

**Statistical analysis:** All measured histological parameters of the leaves were statistically analysed. Differences were observed in the height of the abaxial epidermis and spongy parenchyma cells of *C. arabica*, while the height of the adaxial epidermis cells was higher than in *C. liberica*. The width of the vascular bundles of Arabic coffee was higher than that of *C. benghalensis*. The height and width of palisade parenchyma cells, and cuticle thickness were higher in *C. benghalensis* than in the other two species. In addition, the width of abaxial epidermis cells was bigger in *C. liberica* than in the other selected species.

### 3.2.2.2. Histology of the petioles

Petioles were similar in their histological features in the studied plants. It is covered by one-cell-layer epidermis in each plant. The collateral closed bundles,

which consist of phloem and xylem elements similarly to the bundles of the leaf, are surrounded by isodiametric parenchyma and sclerenchymatous cells. The central bundle is circular closing on the adaxial surface of the petiole, which continues in 6 smaller bundles in Arabic, and 4 in Bengal coffee. Central bundle closes with itself in the petiole of Liberian coffee. Ca-oxalate rosette crystals can be observed among the isodiametric cells in each species. However, the measured values of parenchyma cells were similar in Arabic (39.75 and 38.25  $\mu\text{m}$ ) and Bengal coffee (32.57 and 38.28  $\mu\text{m}$ ), Bengal coffee had the highest epidermis cells (23.17/19.49 and 20.94/18.39  $\mu\text{m}$ ) and the widest bundles (287.51  $\mu\text{m}$ ) in the petiole compared with the other species.

**Statistical analysis:** All measured histological parameters of the petioles were statistically analysed. The petiole of *C. benghalensis* can be described by most statistical differences compared with the other two species: however, the width of adaxial and abaxial epidermis, as well as the thickness of the adaxial cuticle of *C. benghalensis* was higher than those of *C. arabica* and *C. liberica*, the height of adaxial epidermis, both height and width of parenchyma cells and the width of vascular bundles of *C. benghalensis* were similar to *C. arabica*. In addition, the width of abaxial epidermis, parenchyma and cuticle thickness measured in Arabic was similar to that of *C. liberica*.

### 3.2.2.3. Histology of the stems

Similar to the leaf and the petiole, the stem is covered by one-cell-layer epidermis in each plant. The cortex consisting of parenchyma cells is thicker in Arabic coffee (10-12 cell rows), than in Bengal (7-8 rows) and Liberian coffee (6-8 rows). These cells are isodiametric in Arabic and Liberian, also isodiametric in the outer 5-6 rows, but flattened in the internal rows in Bengal coffee. The vascular elements form a concentric ring in the middle of the stem which is surrounded by one-cell-layer sclerenchyma in each plant. Among the phloem and xylem elements a thin cambium layer extend. The medullary part in the middle of the stems is filled with isodiametric parenchyma cells in all coffees. Even though Bengal coffee presented the highest epidermis cells (16.41 and 17.39  $\mu\text{m}$ ), Liberian coffee can be described with the biggest parenchyma cells (43.64 and 46.21  $\mu\text{m}$ ) in the stem.

**Statistical analysis:** All measured histological parameters of the stems were statistically analysed. However, both the height and width of the parenchyma cells were the highest in *C. liberica*, the epidermis cells were highest in Bengal coffee. Statistical differences were not observed in the width of epidermis cells of the studied species.

#### 3.2.2.4. *Histology of the fruits*

The fruit includes 2 bean-shaped seeds in each species which turn to each other with their flattened side. The pericarps are covered by one-cell-layer epidermis. The majority of the parenchyma cells are isodiametric. Collateral closed bundles can be found around the seeds in each plant. In addition, the seeds of Bengal coffee are surrounded by elongated sclereids in 2-3 rows which can be correctly observed in fluorescent light. However, the height and width of epidermis cells were similar in both Arabic (11.22 and 15.07  $\mu\text{m}$ ) and Bengal coffee (17.22 and 13.35  $\mu\text{m}$ ), parenchyma cells were bigger in Bengal coffee (28.03 and 51.67  $\mu\text{m}$  height and width) than the other plants. Due to the large size of the fruits, the structure of the whole cross sections could not be completely observed under microscope, therefore the preparations were documented by macroscopy.

**Statistical analysis:** All measured histological parameters of the fruits were statistically analysed. However, the epidermis cells were higher in *C. benghalensis* and *C. liberica* than in *C. arabica*, the width of parenchyma cells was the highest in *C. benghalensis*. Statistical differences were not observed in the width and height of epidermis cells in the studied species.

### 4. Phytochemical study of the selected *Coffea* species

#### 4.1. Materials and methods

##### 4.1.1. Sample preparation

The samples of *C. arabica*, *C. benghalensis* and *C. liberica* were collected in the Botanical Garden, University of Pécs in the spring of 2014 and 2015. Samples were collected from 2 plants per each species. The analyses were carried out at the Department of Pharmacognosy, University of Pécs and Semmweis University, and the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmacy, “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj Napoca.

For HPLC-ESI/MS studies, 2.5 g of dried and ground leaf, immature pericarp and seed were extracted with 5% ethanol (47.5 mL). Non-hydrolysed and hydrolysed samples were prepared in the case of *C. arabica* and *C. benghalensis*. For the hydrolysis the extracts were diluted with HCL 2N 1:1 and they were kept at 80 °C in water bath for 60 min. The hydrolysed extract was supplemented with distilled water for further study.

For HPLC-ESI-MS/MS analyses, all samples were powdered and extracted using Soxhlet-extraction method (70:30 v/v% methanol:distilled water). After evaporation of the solvent the residues were redissolved in 5 mL 70:30 v/v% methanol-water mixture. Apolar compounds were removed by liquid-liquid extraction with petroleum ether if needed. The seed and pericarp extracts were used until the appearance of the opalescence. Prior to evaluation, all samples were

submitted to SPE purification (500 mg/3mL Supelco Supelclean LC-18 SPE cartridges, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and they were filtered through Sartorius Minisart RC15 syringe filters (0.2  $\mu\text{m}$ , Goettingen, Germany). The extractions were carried out with 150 mL solvent lasted 8 hours. Chlorogenic acid was used as a standard compound, while the other compounds were identified by data of scientific literature.

For the study of total polyphenol and tannin content, 0.5 g powdered immature and mature pericarp and seed of each species were mixed with 150 mL distilled water, and then they were heated on water-bath for 30 min at 70°C. The cooled extracts were transferred quantitatively to a 250 mL volumetric flask, then they were filtrated and used for the reactions.

#### 4.1.2. HPLC-ESI/MS

Polyphenolic compounds were determined by LC/MS which is based on earlier analyses, however, some modifications were added in our work. The major one is the changing of the components of mobile phase (acetic acid instead of potassium phosphate). The reason of this is to obtain supplementary information about polyphenolic compounds. Due to overlapping of caffeic acid with chlorogenic acid, as well as that of caftaric acid with gentisic acid, they were determined qualitatively by LC/MS/MS method as the UV identification was not possible.

Chromatographic separations were performed on an Agilent 1100 HPLC Series system (Agilent, USA) equipped with degasser, binary gradient pump, column thermostat, autosampler, and UV detector. The HPLC system was coupled with an Agilent 1100 mass spectrometer (LC/MSD Ion Trap VL). For the separation, a reverse-phase analytical column was employed (Zorbax SB-C18, 100x3.0 mm i.d., 3.5  $\mu\text{m}$  particle). The work temperature was 48 °C. The detection of the compounds was carried out on both UV and MS modes. The UV detector was set at 330 nm until 17.5 min, then at 370 nm. The MS system operated by an electrospray ion source in negative mode. The chromatographic data were processed using Chem Station and Data Analysis software (Agilent, USA). The mobile phase was a binary gradient prepared from methanol and solution of acetic acid 0.1% (v/v). The gradient method was: 0 min 5 v/v% methanol, 35 min 42 v/v% methanol, 38 min 42 v/v% methanol, 45 min 5 v/v% methanol – rebalancing.

The MS signal was used only for qualitative analysis based on specific mass spectra of each polyphenol. The UV trace was used for the quantification of the identified compounds used MS detection. Using chromatographic conditions described above, the used 18 polyphenol standards were eluted in less than 35 minutes. These were the followings: caftaric, gentisic, caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric, ferulic, and sinapic acids, as well as hyperoside, rutoside, myricetin, fisetin, quercitrin, quercetin, patuletine, hyperoside, isoquercitrin, kaempferol, apigenin, and luteolin.



A signal was also observed at  $t_R = 12.5$  which was presumably *cis*-ferulic acid. This compound forms through the isomerisation from ferulic acid.

#### 4.1.3. HPLC-ESI-MS/MS

Chromatographic analyses were performed on an Agilent 1100 HPLC Series system coupled with an Agilent 6410 Triple Quadrupole mass spectrometer using an electrospray ionsource in negative ionization mode. For separation, a ZORBAX SB-C18 3.0x150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  column was used. As mobile phase A and B, 0.3 v/v% acetic acid in water and methanol were used respectively with a gradient method as follows: 0 min 10 v/v% B, 30 min 100 v/v% B, 35 min 100 v/v% B. The temperature of the column was kept at 25 °C. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ . ESI conditions were as follows: temperature: 350 °C, nebulizer pressure: 40 psi ( $\text{N}_2$ ), drying gas flow rate: 9 l/min ( $\text{N}_2$ ), capillary voltage: 3500 V, fragmentor voltage: 100 V; according to structural differences, collision energy was changed between 10-50 eV. High purity nitrogen was used as collision gas. Full mass scan spectra were recorded over the range  $m/z$ 70-1000 (1 scan/sec). Masshunter B.01.03 software was used for data acquisition and qualitative analysis. For unambiguous identification, retention times, UV and mass spectra were compared with literature data and those of authentic standards.

#### 4.1.4. Total polyphenol and tannin content

The powdered samples were heated with 15.0 mL distilled water for 30 min. The cooled extracts were diluted to 25.0 mL with distilled water, then they were filtrated and the first 50 mL was discarded from each extract.

##### *a. Total polyphenols*

This method is based on the assay described in EUROPEAN PHARMAOPOEIA 7<sup>th</sup> ed (2010). 5.0 mL of the filtrate was diluted to 25.0 mL with distilled water, then 2.0 mL of the solution was mixed with 1.0 mL of phosphor-molybdo-tungstic reagent and 10.0 mL of distilled water, finally it was diluted to 25.0 mL with a 290 g/L solution of sodium carbonate. After 30 min, the absorbance was measured at 760 nm (A1) against distilled water by Metertech UV/VIS SP8001 Spectrophotometer.

##### *b. Polyphenols not adsorbed by hide powder*

10 mL of the filtrate was mixed with 0.10 g of hide powder and shaken for 60 min. 5.0 mL of the filtrate was diluted to 25.0 mL with distilled water, then 2.0 mL of this solution was mixed with 1.0 mL of phosphor-molybdo-tungstic reagent and 10.0 mL of distilled water. Then the mixture was diluted to 25.0 ml with a 290 g/L solution of sodium carbonate. After 30 min, the absorbance was measured at 760 nm (A2) against distilled water.

### c. *Pyrogallol standard solution for polyphenol content*

50.0 mg of pyrogallol was dissolved in distilled water and diluted to 100.0 mL with the same solvent. 5.0 mL of the solution was diluted to 100.0 mL with distilled water, then 2.0 mL of this solution was mixed with 1.0 mL of phosphor-molybdotungstic reagent and 10.0 mL water. This mixture was diluted to 25.0 mL with a 290 g/L solution of sodium carbonate. After 30 min, the absorbance was measured at 760 nm ( $A_3$ ) against distilled water.

Each analysis was performed in duplicate. Polyphenol contents were calculated with the following formulas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7<sup>th</sup> ed 2010):

*Polyphenols not adsorbed by hide powder:*  $[62.5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2] / A_3 \cdot m_1$

$m_1$  = mass of the sample to be examined in grams

$m_2$  = mass of pyrogallol in grams

*Total polyphenols:*  $[62.5 \cdot A_1 \cdot m_2] / A_3 \cdot m_1$

$m_1$  = mass of the sample to be examined in grams

$m_2$  = mass of pyrogallol in grams

## 4. 2. Results and discussion

### 4.2.1. Compounds detected by HPLC-ESI/MS

#### *Detection and evaluation of polyphenols*

These analyses were carried out on the leaf, immature pericarp and seed samples of *C. benghalensis* and *C. arabica*.

Nine polyphenolic compounds involving 5 phenolic acids (caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid), and 4 flavonols (quercetin, isoquercetin, kaempferol, rutin) were identified and quantified in the samples of Bengal coffee. Phenolic acids were identified also in the leaf, immature pericarp and seed, but flavonols appeared only in the leaf and the immature pericarp of the species.

Some differences were found in the non-hydrolysed and hydrolysed extracts of the leaf of Bengal coffee. In the non-hydrolysed extracts, chlorogenic acid was the dominant compound in the immature seed, while rutin was identified as a least component in the immature pericarp. In the hydrolysed extracts, caffeic acid was detected in a large amount in the leaf, but kaempferol was observed only at a low level in the immature pericarp. Phenolic acids (caffeic and ferulic acid) were found in largest amount in the hydrolysed leaf extract, chlorogenic acid in the non-hydrolysed and *p*-coumaric acid in the hydrolysed extracts of the immature seed. Among the identified flavonols of the leaf in both species, isoquercitrin and rutin were detected as dominant compounds in the non-hydrolysed extract, while quercetin and kaempferol in hydrolysed ones. In earlier reports, according to the protective role of polyphenol, the amounts of total phenols were the same in the

leaves of fruit-producing and non-producing plants during plant development (SALGADO et al. 2008). In the immature pericarp, each selected compound was represented at a low level which is due presumably to various environmental factors which were not studied in this work.

Compared the identified and quantified polyphenols of *C. benghalensis* and *C. arabica*, some differences were found in the values of chlorogenic, ferulic, *p*-coumaric and sinapic acid which occur in larger amount in the leaf and the seed of Arabic than in Bengal coffee, however, sinapic acid was observed only in the leaf of Arabic coffee. In contrast, flavonols occur at a higher level in the leaf of *C. benghalensis* than in *C. arabica*.

#### **4.2.2. Compounds detected by HPLC-ESI-MS/MS**

These analyses were performed in all samples of each studied coffee species. Altogether 25 phenolic components were identified in the extracts of the studied parts of all species. 22 compounds were found in Bengal coffee, and among them, 16 phenolic acid derivatives (e.g. caffeoylquinic acids), 2 flavan-3-ols, 2 procyanidin dimers and 2 procyanidin trimers, a xanthonoid, and 2 aliphatic tricarboxylic acids were qualitatively characterized by comparison of their LC-ESI-MS/MS data with literature and mass spectral data of reference compounds.

Phenolic compositions of the studied coffee species were similar with minor differences. Chlorogenic acid was observed as main component in each extract. 4-caffeoylquinic acid (4-CQA) and 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) were detected in each sample, except the latter was missing in *C. arabica* leaf extract. Dicafeoylquinic acids (diCQAs) were characteristic to most extracts, 4,5-diCQA (24) was present in all samples, except Bengal coffee immature pericarp, while 3,4-diCQA (22) was detected in each sample excluding the mature pericarp of Liberian coffee and the immature pericarp of Bengal coffee. In addition, isocitric acid was described in all samples. The most complex composition including 17 compounds was detected in the immature pericarp of Arabic coffee, followed by the extract of the mature pericarp of Bengal coffee, and the leaf extract of Liberian coffee (16 compounds each).

##### *Coffee leaf extracts*

3-CQA was present in all leaf samples, being the main compound of *C. arabica* extract. 5-CQA was the main component of *C. benghalensis* and *C. liberica*. 5-coumaroylquinic acid (5-CoQA) and a further isomer of 5-CQA were present in Liberian coffee. 4-CQA, diCQAs and ferulic acid, as well as mangiferin were detected in all samples. The identification of mangiferin was in concordance with earlier works (TREVISAN et al. 2016, CONÉJÉRO et al. 2014). In addition, TREVISAN et al. (2016) denoted higher total mangiferin content in the leaf of plants growing under

natural full-sun conditions compared to other ones living in management used organic treatment, which was not studied in our work.

In contrast to an earlier finding (CONÉJÉRO et al 2014), we did not identify 5-caffeoylquinic acid in *C. arabica*, but procyanidin trimers were described in each leaf sample.

The results underline the presence of chlorogenic acids in Arabic coffee identified also earlier by KY et al. (2007), which were previously detected in the non-hydrolysed extracts of both leaf and immature fruit of Arabic and Bengal coffee in our LC/MS studies.

#### *Immature pericarp extracts*

5-CQA was characterized as the main component of all samples, additionally, 4-CQA and catechin/epicatechin also were abundant in all studied species. Moreover, Arabic and Liberian coffee contained 3-CQA, a further isomer of 5-CQA, 4-feruloylquinic acid (4-FQA), 3,4-diCQA, 3,5-diCQA and 4,5-diCQA, as well. Our actual findings are in concordance with our previous studies as ferulic acid was identified in both investigations. Even though, according to our previous studies, the quantified ferulic acid concentration was insignificant in the immature pericarp of Bengal coffee.

#### *Immature seed extracts*

The main compound of all coffee immature seed samples was 5-CQA, followed by 4-FQA, 4-CQA and 3-CQA, in addition, 5-CoQA and 5-FQA were identified in Arabic and Liberian coffees. The latter was characterized by the presence of a procyanidin dimer and 5-CQA methyl ether that could be detected only in both immature and mature seed of Liberian coffee. The diCQA compounds were described for *C. benghalensis* and *C. arabica*, while Liberian coffee contained only 3,4-diCQA and 4,5-diCQA.

According to our previous studies, the ferulic acid concentration was the same in the non-hydrolysed extract of the immature seed than in the leaf of Bengal coffee. The results overlap with the findings of an earlier comprehensive work mentioned the presence of chlorogenic acids (FARAH and DONANGELO 2006). Even though, they also described these phenolic compounds in the immature seed of Arabic coffee, we identified in plus isocitric acid, caffeoyl hexoside, and catechin/epicatechin. However, they mentioned the presence of 5-caffeoylquinic acid, this compound was not identified in our green seed sample of Arabic coffee.

The results overlap with our earlier work as the quantity of chlorogenic acids were three times higher in the non-hydrolysed extract of the immature seed of Arabic coffee than that of Bengal coffee.

### *Mature pericarp extracts*

Similarly to the immature seed samples, the main compound of the mature pericarp extracts was 5-CQA, while 4-CQA was present in smaller amount in each species. For Bengal and Arabic coffees, 3-CQA, 5-CQA, 5-CoQA, 4-FQA and diCQA compounds were described, as well. Liberian coffee extract contained only 4,5-diCQA. Flavan-3-ols and a procyanidin compound were detected in Bengal coffee.

### *Mature seed extracts*

In the mature seed extracts, 5-CQA was identified as the main compound in Bengal and Arabic coffee, while 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA and the diCQAs were detected as minor components. In addition, Bengal coffee was characterized by the presence of 5-FQA. The 5-CQA and 4-CQA isomers were detected with comparably high intensity in Liberian coffee extracts. Minor components of the mature seed samples were 3-CQA, 5-CoQA, 4-FQA and diCQAs. Only the sample of *C. liberica* contained citric acid. KY et al. (2007) and CAMPA et al. (2005) also identified and quantified chlorogenic acids in the fruit of Liberian coffee, which results confirm our more detailed studies. Catechin, epicatechin, flavonols, anthocyanidins, flavan-3-ols and hydroxycinnamic acids like caffeoylquinic acid, its derivatives and *p*-coumaroylquinic acid studied by ASCENSION et al. (2004) support our investigations and underline that the constitutive units of Arabic coffee fruit was mainly epicatechin, representing more than 90% of the proanthocyanidin units.

### **4.2.3. Total polyphenol and tannin content**

The highest tannin content was found in the leaf of Arabic coffee followed by the immature pericarp of Bengal coffee and the leaf of Liberian coffee. The least tannin content was detected in the mature seed extract of each species and in the immature pericarp of Liberian coffee.

The highest polyphenol content was measured in the leaf of each species while the least content was observed in the mature pericarp of *C. liberica*. In addition, a high polyphenol concentration value was detected in the mature seed of all three species. The leaf of Arabic coffee had the highest total tannin, polyphenol content compared to all parts of the studied species.

Related to the seed extracts, the total polyphenol content of immature seed of Bengal coffee were lower than its tannin content. Our present results overlap with our previous work as the total tannin content of the mature seed extract of Bengal coffee was insignificant in comparison with the other plant parts. However, the scavenger activity of the mature seed extract of Liberian coffee was the highest, the total polyphenol content of the mature seeds of Bengal coffee was higher than the mature seeds of Arabic and Liberian coffee. In comparison with earlier studies (NAIDU et al.

2008), the total polyphenol content and the antioxidant activity of green seed extract of *C. arabica* were higher prepared with isopropanol and water (60:40) than in our study. These differences could be explained by different extraction methods.

In the pericarp, even though the total tannin content of the mature pericarp extract of Arabic coffee were higher than that of Bengal coffee, the total polyphenol content of the mature pericarp of Bengal coffee was the highest in comparison with the other species.

## **5. Antioxidant activity of the selected *Coffea* species**

### **5. 1. Materials and methods**

#### **5.1.1. Sample preparation**

The samples of *C. arabica*, *C. benghalensis* and *C. liberica* were collected in the Botanical Garden, University of Pécs in the spring of 2014 and 2015. Samples were collected from 2 plants per each species. The analyses were performed at the Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs.

For all used antioxidant assays (ECL, DPPH, ORAC), the immature and mature pericarp, as well as the seed of each species were ground (0.25 g each) and extracted with 5 mL 50% ethanol. The extracts were shaken for 20 min (KL-2, Edmund Bühler GmbH, Germany), then they were filtered and stored at 4 °C in the dark until analyses (less than 7 days). We could not study leaf samples because of chlorophyll content which caused not clear solutions.

#### **5.1.2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method**

4 mg DPPH was prepared in 100 mL methanol (0.1 mmol/L) and kept in the fridge being stable for at least 1 week. For absorbance measurements standard 96-well microplates (Sarstedt) were applied. 20 µL Trolox standard/blank/sample and 180 µL DPPH solution were pipetted into the wells by multichannel pipette, then they were mixed, and the absorbance was read at 517 nm after 30 minutes incubation in the dark at 25 °C.

#### **5.1.3. Enhanced chemiluminescence (ECL) method**

*Reagents:* Before the analysis, 15 µU/mL POD working solution was freshly prepared from 1.5 U/mL POD stock stored at -20 °C in phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4) by dilution with BSA containing phosphate buffer, then it was kept on ice. A working reagent of 1360 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was also freshly diluted with 0.1% citric acid from 10 M concentrated stock solution and it was also kept on ice protected from light. During the whole period of measurements these reagents were stored in melting ice. Both working solutions were stable for at least several hours.

The chemiluminescence detection reagent was prepared separately by dissolving luminol and *p*-iodophenol in 0.2 M boric acid/NaOH buffer, pH=9.6 and it was refrigerated at 4 °C in brown bottles with a shelf life of several weeks. Trolox was used as standard in both assays. Trolox at 1 mM concentration was freshly dissolved in 50% ethanol weekly and kept at 4 °C. Depending on the assay, Trolox dilutions in the range of 0-100 µM were prepared on the day of the experiments with the same diluents applied for the samples.

*ECL antioxidant method:* The chemiluminescence reaction was performed in 96-well white optical plates (Perkin-Elmer). The enzyme working solution and the ECL reagent was premixed (200 µL POD + 70 µL ECL reagent) and kept on ice. The wells were filled with 20 µL Trolox/blank/sample and 270 µL of POD-ECL reagent was pipetted into each well with an 8-channel micropipette. The reaction was initiated by automated injection of 20 µL ice-cold H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citric acid (final concentrations of the components in the wells: 0.97 µU/mL POD, 101.6 µM luminol, 406.4 µM *p*-iodophenol, 88 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The chemiluminescence signal was followed for 20 min.

#### **5.1.4. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay**

4 µM fluorescein (FL) stock was prepared in 75 mM phosphate buffer of pH=7.4 (stable for 1 week in the fridge). The working FL solution was made freshly diluting the stock with phosphate buffer at a 1:99 ratio (40 nmol/L). AAPH was also prepared just before the measurements in phosphate buffer (400 mM). Trolox standards were used as described above. Into each well of black optical plates (Perkin Elmer) 25 µL of blank/standard/sample and 150 µL of diluted FL were pipetted and the plates were preheated to 37 °C for 20 min. The outer wells of the plates were filled with 200 µL phosphate buffer, and only the inner 6x10 matrix was used for the assay. The reaction was initiated by automated injection of 25 µL AAPH solution into each well, and fluorescence intensities were immediately monitored for 80 min (490/520 nm) at 150 s intervals. The final concentrations of the components in the wells were as follows: FL 30 nM, AAPH 50 mM, Trolox 0 – 33.3 µM.

#### **5.1.5. Instrumentation and interpretation of data of antioxidant tests**

For the ECL based measurements a Biotek Synergy HT plate reader equipped with programmable injectors was used. After initiation of the reaction by injection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, light detection was immediately started with 0.2 s measuring time/well for 20 min at 64 s measuring intervals. Trolox standards in 50% ethanol were applied in the range of 0-15 µM final concentrations in the wells and a 32-fold dilution with 50% ethanol of plant extracts were used for the measurements (n = 12 replicates for each sample). The total antioxidant capacity (TAC) of the extracts was calculated from the regression equation obtained for the standards, multiplied by the dilution

factor and expressed as  $\mu\text{M}$  Trolox equivalent (TE). TE for each plant extract was referred to 1 g of initial dry material.

For the DPPH assay, a Perkin Elmer EnSpire Multimode reader was used in absorbance mode, equipped with monochromators. Standardization of the assay was done by application of 0-25  $\mu\text{M}$  Trolox/well final concentrations in 50% ethanol, and absorbance values were read at 517 nm after 30 min of incubation at 25 °C (with 5 s shaking before the measurement). Antioxidant capacities were calculated either by using the equation of the calibration line or by expressing the antioxidant activity of the extracts in % of the blank using the formula:  $(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) * 100$ . TAC values were also referred to 1 g of dried plant and were given as TE/g or % TAC/g.

For the ORAC assay the Biotek Synergy HT plate reader was used in fluorescence mode at 37 °C with 490 nm excitation and 520 nm emission filter settings. After 20 min incubation of the plate containing blanks/standards/samples and FL at 37 °C, the AAPH start reagent was automatically injected into the wells and readings were taken in every 150 s for 80 min with 100 intensity readings/well at each measuring point. TE was calculated by subtraction of the fluorescence intensities of the corresponding blank values from those of the Trolox standards (net area under curve, nAUC), and this way a calibration line was obtained based on nAUC vs. Trolox concentrations. TE data for the examined plants were obtained from the regression equation of the standards and they were also referred to 1 g of dry plant.

## 5. 2. Results and discussion

We could quantify the antioxidant activity by all three methods in each tested plant extract. The ECL and DPPH TE/g values showed loose correlation ( $R^2=0.587$ ,  $p=0.083$  by Student's t-probe) while those obtained for the ORAC assay were considerably higher with a more uniform pattern and without correlation with the other two assays' data. The imprecision of the three assays was acceptable (ECL:  $\leq 5\%$ , DPPH:  $\leq 10\%$ , ORAC:  $\leq 2\%$ ). The DPPH data were also calculated as % TAC using the equation described in 2.8. Our results showed closer correlation between the ECL method and the percentage antioxidant capacity obtained by the DPPH technique ( $R^2=0.6107$ ,  $p=0.161$  by Student's t-probe).

The biggest difference was found in the immature pericarp of *C. benghalensis* and the mature pericarp of *C. liberica* where the DPPH method showed much higher antioxidant capacity than the ECL and ORAC assay. In contrast to the data of KIRAN et al. (2011), we found lower antioxidant activity in the case of the mature fruit extract of *C. benghalensis* measured by DPPH assay, while the value of the immature pericarp was higher in our study measured by DPPH method. For the reason of low  $R^2$  value, the different applied methods can be mentioned which resulted diverse



radicals and diverse radical's neutralization. In addition, the detector system and the antioxidants also differ in the assays.

The scavenger activity of the mature pericarp of Liberian coffee was the most significant among the studied plants. Although *C. liberia* is less used in trade, the antioxidant effect of its green seeds is comparable to that of *C. arabica* and *C. robusta* (latter species: based on literature data without analysis in our work).

## **6. Antimicrobial activity of the selected *Coffea* species**

### **6. 1. Materials and methods**

#### **6.1.1. Sample preparation**

The samples of *C. arabica*, *C. benghalensis* and *C. liberica* were collected in the Botanical Garden, University of Pécs in the spring of 2014 and 2015. Samples were collected from 2 plants per each species. The leaf, immature and mature seed and pericarp (0.5 g) were powdered and extracted with 5 mL of 50% ethanol. The solutions were heated on ultrasound water-bath (Elmasonic S 30, Simex) for 20 min at 40°C, then they were filtered. The studies were carried out at the Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs.

#### **6.1.2. Disc diffusion and agar diffusion methods**

During the substrate preparation, a mixture of 1 L of distilled water and 38 g of Mueller-Hinton agar was boiled for 30 min, and then 25-25 mL of it was poured into Petri dishes.

For disc diffusion method, 48 discs were kept in refrigerator until the solution was frozen. Bacteria were suspended in 1.5 mL NaCl 0.9%, then they were separately applied onto the substrate. After this, filter paper discs were placed onto the substrate with 5 mm diameter and 10-10 uL of the tested extracts and standard solution were applied onto the discs.

For agar diffusion method, 100 µL of extracts were measured into the holes made in the agar by sterile metal borers.

The leaf, seed and pericarp extracts were tested by disc diffusion, while the leaf extracts additionally by agar diffusion against four Gram-positive bacteria namely *MRSA* (isolated from a haemoculture of a septic patient), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), and *Streptococcus agalactiae* strains (isolated from a vaginal excretion). *S. aureus* and *B. subtilis* were taken from international strain collections, while *MRSA* and *S. agalactiae* were isolated from clinical samples at the Bacteriological Diagnostic Laboratory, Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs. The antibacterial activity (inhibitory zone measured in mm) of the studied coffee parts of

were compared with commercial antibiotic 5 µg/mL vancomycin as standard. The 48 discs were incubated at 37 °C for 24 h. The tests were carried out in triplicate.

## **6. 2. Results and discussion**

### **6.2.1. Disc diffusion method**

The leaf of Arabic coffee had the highest while the mature seed of Liberian coffee the lowest inhibition against the tested strains. The lowest antimicrobial activity is concerned to the immature pericarp and the mature seed of Liberian coffee, as well as the mature seed of Bengal coffee which showed insignificant inhibition for *S. agalactie* and *B. subtilis*. Our results are in concordance with earlier data about antibacterial properties of the fruit of Bengal coffee tested against *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* (KIRAN et al. 2011, 2012) which we completed with the detected inhibitory effect of the leaf and the immature fruit in our work.

The strongest inhibitory effect against *MRSA* was observed in the leaf of Arabic coffee, while the less one was found in the mature pericarp of Bengal coffee. Against *B. subtilis*, which was most sensible bacteria, all extracts showed bigger inhibitory zones, and among them, the most significant effect had the leaves of Arabic and Bengal coffee. In the case of *S. agalactie*, the most inhibitory activity was described in the leaf extract of Arabic coffee, but the less one in the immature pericarp of Liberian coffee.

### **6.2.2. Agar diffusion method**

The leaf extracts of each species were studied also by agar diffusion method. The results overlap with our previous data related to the leaf extract tested by disc diffusion method. The most sensible bacteria were *MRSA* and *B. subtilis*, while *S. agalactie* admitted as the less sensible strains tested all plant extracts. In comparison, the leaf extract of *C. arabica* and *C. benghalensis* showed the strongest antibacterial effect against *MRSA* and *B. subtilis* used this assay.

The antibacterial effect of the roasted seeds of Arabic coffee was also reported earlier against *B. subtilis* (DAGLIA et al. 1994). In addition, due to their chlorogenic acid content and Maillard reaction products which are generated during seed roasting, the extracts of Arabic coffee showed an inhibitory effect against e.g. *S. aureus* (DAGLIA et al. 1994) which was also successfully tested in our study used the leaf extract of the studied coffee species. Chlorogenic acids which were detected in all species by HPLC-ESI-MS/MS support earlier results related to the antibacterial effect of phenolic acids of the seed of Arabic coffee (LOU et al. 2011, DAGLIA et al. 1994).

## 7. Summary and novel findings

Our study realised a comparative histological, phytochemical and antimicrobial analysis of the widely known and cultivated *C. arabica* and *C. liberica*, and a less studied *C. benghalensis* as a wild species. The determined aims of the work were accomplished highlighting mostly new records of Bengal coffee as follows:

- In histological aspect, the leaf of Bengal coffee can be characterised with thicker cuticle and higher palisade cells extended in 2 rows, highest epidermis cells in the petiole and the stem, and widest and highest parenchyma cells in the fruit compared to *C. arabica* and *C. liberica*.
- In phytochemical aspect, 34 phenolic compounds were identified by HPLC in the leaf, immature and mature seed and pericarp of the selected plants which suggest a significant chemical diversity of coffees. According to the methods of Ph. Eur. 7.0, the leaf of Bengal, Arabic and Liberian coffee produced a high phenolic content. The immature pericarp of Bengal coffee showed a significant tannin, polyphenol and phenolic content besides to the high values of Arabic coffee. In addition, the polyphenol value of the mature pericarp and the seed of Bengal coffee were also high compared to the other plants.
- Among the results of the performed antioxidant assays, ORAC technique showed the highest values of each sample which did not correlate with the results of DPPH and ECL methods. In the case of Bengal coffee, highest values were detected in the immature seed and pericarp used DPPH, and in the mature pericarp by ORAC method compared to the other studied coffee species. The values measured by ECL assay were the highest in each studied part of Liberian coffee.
- In the antimicrobial assays tested the leaf, immature and mature pericarp and seed by disc and agar diffusion methods, all studied parts of Bengal coffee showed inhibitory activity against *MRSA*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*. However, the most significant effect was detected in the leaf of Bengal and Arabic coffee against *B. subtilis*, our studies confirmed similar antimicrobial potential of Bengal coffee compared with Arabic and Liberian species against the studied bacteria strains.

Our findings provide relevant new records on the histological and phytochemical features, as well as the antioxidant and antimicrobial activity of the less studied wild *C. benghalensis* which can present new opportunities and challenges for further possible phytochemical and pharmacological studies of the species.

## 8. Acknowledgements

Firstly I would like to express my deepest gratitude to my supervisor Dr. Nóra Papp for providing me the opportunity to complete my PhD thesis at the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs. I want to thank her for receiving me in their prestigious team and for the opportunity to study and work at their research laboratory. Her confidence, constant support and constructive ideas guided me on the anfractuouse way of science outlining my research profile.

I am greatly thankful to Prof. Dr. Tibor Németh for his essential impulse initiated me on this specific way, and for his priceless advices and continuous support. This dissertation would not have been possible without his help because he introduced me to my PhD supervisor.

I am grateful to Dr. Tímea Bencsik, Viktória Lilla Balázs, Rita Filep (Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs) and Rita Csepregi (Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs) for their assistance in histological and phytochemical studies. I thank for the scientific contribution of Dr. Tamás Kőszegi and Nikolett Sali (Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs) in the antioxidant assays. I also thank to Erika Kocsis and dr. Béla Kocsis (Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs) for her assistance in the antimicrobial experiments.

I would like to thank to Dr. Ágnes Alberti, Dr. Orsolya Csernák (Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Semmelweis University), Dr. Tibor Németh, Dr. Sebastian Németh (Department of Pharmacognosy, University of Oradea), and Dr. Laurian Vlase (Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmacy, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj Napoca) for their help in the HPLC measurements.

I am also grateful to all my professors, colleagues and friends from the Department of Pharmacognosy, University of Pécs for their advices, help, friendship and enjoyable moments spent together.

My work was partially supported by TÁMOP 4.2.3, Domus Szülőföldi Junior Ösztöndíj 2014, Domus Magyarországi Junior Ösztöndíj 2014, Domus Magyarországi Junior Ösztöndíj 2015, and Campus Hungary grants.

Finally, my sincere thanks go to my husband, János István Patay for his constant support and optimistic thinking. He was always understanding and patient with me, especially when I worked long hours at home. In addition, I would like to thank all my family for their help and support as without their help at home I would not be able to finished my PhD thesis.

## 9. Publications, posters and oral presentations related to the thesis

### Publications:

1. **Eva Brigitta Patay**, Fritea Luminita, Andreea Antonescu, Angela Antonescu, Luciana Dobjanschi (2017): Caffeine Research: *Coffea arabica* - a plant with rich content in caffeine. The Question of Caffeine. Chapter II. *RIJEKA: INTECH OPEN ACCESS PUBLISHER*, pp. 27-44, ISBN: 978-953-51-3274-5.
2. **Éva Brigitta Patay**, Nikolett Sali, Tamás Kőszegi, Rita Csepregi, Viktória Lilla Balázs, Tibor Sebastian Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2016): Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE* 9(4): 366-371. (IF=0.925)
3. **Éva Brigitta Patay**, Tímea Bencsik, Nóra Papp (2016): Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE* 9(12): 1127-1135. (IF=0.925)
4. **Patay Eva Brigitta**, Nemeth Tibor, Nemeth T Sebastian, Filep Rita, Vlase Laurian, Papp Nóra (2016): Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne ex. Schult., compared with *Coffea arabica* L. *FARMACIA (BUCHAREST)* 64(1): 125-130. (IF=1.348)
5. **Éva Brigitta Patay**, T Sebastian Nemeth, Tibor Nemeth, Laurian Vlase (2014): Cercetări fitochimice asupra pericarpului speciei *Coffea arabica* L. *PRACTICA FARMACEUTICA/ROMANIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL PRACTICE* 7(1): 12-14.
6. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor Sebastian, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok biológiai, fitokémiai és gyógyászati értékelése. *BOTANIKAI KÖZLEMÉNYEK* 101(1-2): 263-280.
7. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Németh Sebastian, Papp Nóra (2014): Szövettani vizsgálatok *Coffea arabica* L. és *Psilanthus benghalensis* Roxb. levélen és levélnyélen. *GYÓGYSZERÉSZET* 58: 88.

### Poster presentations:

8. **Éva Brigitta Patay**, T S Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2014): Szövettani vizsgálatok *Coffea arabica* L. és *Psilanthus benghalensis* Roxb. levélen és levélnyélen. XVth Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2014. április 10-12.
9. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Németh T Sebastian, Papp Nóra (2014): Historical ethnobotany and antimicrobial effect of some *Coffea* species. 6th ICEB Congress, Córdoba, Spanyolország, 2014. november 17-21. Abstract Book: 321-322.

10. **Patay Éva Brigitta**, Nemeth Tibor Sebastian, Nemeth Tibor, Papp Nóra, Vlase Laurian (2014): Klorogénsavtartalom vizsgálata *Coffea arabica* L. egyes részeiben. XX. Nemzetközi Vegyészkonferencia. Kolozsvár, Románia, 2014. november 6-9. Abstract Book: 119.
11. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): Study of polyphenol content in seed and pericarp of two *Coffea* species. X. Szentágothai János Transzdiszciplináris Konferencia és Hallgatói Verseny, Pécs, 2013. november 4-5. Absztraktkötet: 69.
12. **Bagosi Éva Brigitta**, Papp Nóra, Németh Tibor (2012): A *Coffeae folium* hisztológiai vizsgálata. XIV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Pécs, 2012. szeptember 28. Absztraktkötet: 41-42.

**Oral presentations:**

13. **Éva Brigitta Patay**, Nikolett Sali, Tamás Kőszegi, Sebastian T Németh, Tibor Németh, Nóra Papp (2015): Cercetări fitochimice asupra efectului antioxidant al speciilor de *Coffea*. Simpozion: Actualități în fitoterapie, Cséfa, Romania, 2015. július 4.
14. Papp Nora, Balázs Viktoria Lilla, Bartha Samuel Gergely, Bencsik Timea, Dénes Tunde, Filep Rita, Gyergyák Kinga, **Patay Éva Brigitta**, Joós-Békésiné Kallenberger Helena, Tóth Monika, Farkas Ágnes (2017): Gyógynövények hisztológiai értékelése - oktatás és kutatás a pécsi Farmakognóziás Intézetben. XV. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Budapest, 2017. szeptember 7., Összefoglalók: 12.
15. **Patay Éva**, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok mikrobiológiai vizsgálata Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 267. Szakülése, Pécs, 2014. november 13.
16. **Patay Éva Brigitta**, Nemeth Tibor, Nemeth T Sebastian, Papp Nóra (2014): Microbiological studies of some *Coffea* species. 13th Zilele FMF Oradea Nagyvárada, Románia, 2014. december 13. Abstract Book: 64-66.
17. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): *Coffea* taxonok összehasonlító hisztológiai és fitokémiai értékelése. Fialat Gyógynövénykutatók Fóruma: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája. Budakalász, 2014. február 14., Összefoglalók: 14.
18. **Patay Éva Brigitta**, Németh Tibor, Papp Nóra (2014): Gondolatok a kávéról - kicsit másképp. Dombóvári Herbárium előadássorozata, Dombóvár, 2014. április 4.
19. **Éva Bagosi**, Nóra Papp, Tibor Németh (2013): Determinarea acidului cafeic din *Coffeae pericarpium* prin metoda HPLC. Zilele farmaceutice Orădena, Băile Felix, Romania, 2013. május 17-18.

20. **Patay Éva**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): Cercetări fitochimice asupra diferitelor specii de *Coffeae semen* și *Coffeae pericarpium*. Principii și aplicații Szimpóziu, Nagyvárad. 2013. 09. 13-14
21. **Patay Éva**, Németh Tibor, Papp Nóra (2013): *Coffea* fajok fenoloidjainak vizsgálata HPLC-vel. Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoport 258. Szakülése, Pécs, 2013. november 7.
22. **Éva Brigitta Bagosi**, Sebastian Németh, Laurian Vlase, Tibor Németh (2012): Cercetări fitochimice asupra *Coffeae folium*. Zilele Farmaceutice Oradene: Impactul Științelor Farmaceutice în Asistența de Sănătate: Ediția a VI-a, Oradea, România, Editura Universitatea din Oradea, 2012, Abstract Book: 9-12.
23. Ioana Dohotar, **Éva Brigitta Bagosi**, Luminița Fritea, Diana Fritea, Fawzi Tifur (2011): Consumul Drogurilor în rândul tinerilor. Din preocupările profesorilor. Nagyvárad, Editura Aureo, 2011, Abstract Book: 126-132.