

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Rizikové látky ve včelích produktech a jejich vliv na konzumenty**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Jan Jenšovský**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Boris Hučko, CSc.**

**© 2015 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rizikové látky ve včelích produktech a jejich vliv na konzumenty" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2015

---

Děkuji

# **Rizikové látky ve včelích produktech a jejich vliv na konzumenty**

## **Hazardous substances in bee products and their impact on consumers**

### **Souhrn**

Tato práce se zabývá obsahem a vlivem sekundárních metabolitů, hlavně pyrrolizidinovými alkaloidy, jež se vyskytují v medu. Dále obsahem reziduí pesticidů a obsahem těžkých kovů v medech. Alkaloidy jsou součástí rostlin a vyskytují se u více než 560 rostlinných druhů a to převážně kulturních rostlin z čeledí Asteraceae, Boraginaceae, Apocynaceae a Fabaceae. Pyrrolizidinové alkaloidy jsou estery alkaloidů složené z necinové báze esterifikované do jedné nebo více necinových kyselin. Hlavní část známých pyrrolizidinových alkaloidů mají dvě společné věci, a to bazální necin, který je často složen z 1, 2- nenasyceného retronecinu a nebo se v rostlinách vyskytují v odpovídajících N-oxidech. Četně se vyskytující alkaloid byl retrosin a senecionin z rodu Senecio. Dále byl v medech objeven imidaklopid, jenž patří mezi neonikotinoidy, což je hojně používaný insekticid používaný v zemědělství na hubení škůdců. Tyto toxické látky mají přímý vliv také na včely, které sbírají nektar a pyl kontaminovaný imidaklopidem. Užívání insekticidů v zemědělství hraje velikou roli v ubývání včelstev. Dále v práci pojednávám o rizicích přítomnosti těžkých kovů v medech a jejich možným vlivem na organismus. Přítomnost těchto těžkých kovů je do jisté míry možným indikátorem kontaminovaného prostředí způsobené průmyslem.

### **Summary**

This work deals with the content and effect of secondary metabolites, mainly pyrrolizidinovými alkaloids, which are found in honey. Furthermore, the content of pesticide residues and heavy metals in honeys. Alkaloids are part of the plant and affects more than 560 plant species, mostly cultivated plants in the family Asteraceae, Boraginaceae, Apocynaceae and Fabaceae. Numerous occurring alkaloid was retrosin and senecionin of the genus Senecio. It was also discovered in honeys imidaclopid, which is one of the neonicotinoids, which is

widely used insecticide used in agriculture for pest control. These toxic substances have a direct influence on the bees that collect nectar and pollen contaminated with imidacloprid. Furthermore, the work deals with the risks of the presence of heavy metals in honeys and their potential effect on the body. The presence of these heavy metals, is to some extent possible indicator of a contaminated environment caused by industry.

**Klíčová slova:** sekundární metabolity, pesticidy, med, včely

**Keywords:** secondary metabolites, pesticides, honey, honey bees

# Obsah

Obsah.....	5
1. Úvod.....	6
2. Cíl práce .....	7
3. Literární rešerše.....	8
3.1 Včelí produkty ve výživě člověka .....	8
3.1.1 Med .....	8
3.1.2 Propolis .....	12
3.1.3 Mateří kašička .....	15
3.2 Možné rizikové faktory v medu .....	17
3.2.1 Pesticidy v medu .....	17
3.2.2 Toxické látky pyrrolizidinové alkaloidy .....	19
3.2.2.1 Pyrrolizidinové alkaloidy a jejich obsah v nektarech a pylích .....	21
3.2.2.2 Pyrrolizidinové alkaloidy a jejich záchyty v medu.....	22
3.2.2.3 Pyrrolizidinové alkaloidy a toxicita u lidí.....	24
3.2.2.4 Ostatní toxické nektary .....	25
3.3 Ostatní netoxické sekundární metabolity.....	31
3.3.1 Kofein .....	31
3.3.1.1 Kofein a jeho obsah v nektarech .....	31
3.3.1.2 Toxicita kofeinu u lidí.....	32
4. Závěr.....	34

# 1. Úvod

Med, světlá až mírně tmavá látka lehce tekuté konzistence a sladké chuti. Asi každý ho někdy jedl nebo ochutnal. Po mnoho let byl med používán pro své zázračné vlastnosti, ovšem v posledních letech se zvyšuje počet případů, kdy může dojít k tzv. otravě z medu. Na vině je řada toxických látek, např. sekundárních metabolitů, reziduí pesticidů a těžkých kovů.

Je med opravdu tak zdraví škodlivý, jak se na první pohled zdá?

Med jako potravina má řadu významných látek pro zdraví, jako antioxidanty, fenolické látky a sacharidy. V posledních letech, se zvyšující se životní úrovní se zvyšuje i riziko bezpečnosti potravin a produktů jako jsou včelí produkty, protože med a další včelí produkty (propolis a mateří kašička jsou) jsou indikátory životního prostředí. V průběhu výroby medu, včely do medu přidávají nektar a pyl, který může být kontaminován již zmíněnými toxickými látkami. Tyto látky se následně v organismu kumulují a tak organismus poškozují. Avšak ne vždy mají sekundární metabolity v nektaru a medu negativní dopad. Některé studie zabývající se výskytem sekundárních metabolitů popisují možný antimikrobiální účinky medu a nektaru ba dokonce možné repelentní účinky působící na včely.

Mírou kontaminace a toxicity medu se zabývá tato práce.

## 2. Cíl práce

Cílem práce je analyzovat vědecké studie, které pojednávají o toxicitě medu obsahující sekundární metabolity a kontaminanty z vnějšího prostředí. Dále složením a významem medu a dalších včelích produktů ve výživě člověka, u nichž bylo zjištěno, že pro svůj obsah fenolů, minerálních látek, proteinů a sacharidů, mají velmi příznivý vliv na lidské zdraví.

Na druhé straně výskyt reziduí, a sekundárních metabolitů vyvolávají u lidí, ale i u včel řadu zdravotních potíží, které mohou vést i k smrti. Nejvíce rizikovými látkami jsou uměle přidávány chemické látky, jako jsou pesticidy, jež se v menších koncentracích v organismu kumulují a zvyšují tak toxicitu v organismu v průběhu několika let. Druhým kontaminantem, jež má význam i na ekologické faktory, jsou těžké kovy, které se vyskytují i v medu.

Tato práce je založena na vědeckých studiích a na zhodnocení pozitivních a negativních dopadech na zdraví lidí i včel, jakož i na živočišný druh, který je pro svoji činnost velmi důležitým faktorem v ekosystému.

### 3. Literární rešerše

Úkolem této práce je objasnit problematiku medu a včelích produktů, tak i toxicity medu a jeho vliv na lidský organismus. Jelikož je med součástí potravinového a farmakologického průmyslu, byl med podstoupen řadě výzkumů.

#### 3. 1 Včelí produkty ve výživě člověka

Včelí produkty se používaly už od starověku. Je jich celá řada, ovšem nejvýznamnější je med, propolis a mateří kašička.

##### 3. 1. 1 Med

Nejvýznamnější a nejvíce užívaný produkt je *včelí med*. Med je přírodní produkt produkovaný včelami a to jako med květový získaný z nektarů květin, anebo med medovicový (lesní med) získaný z vyloučených výměšků sajícího hmyzu rostlin (mšic). (Ajibola, Chamunorwa et al. 2012) Včely sbírají a zpracovávají nektar nebo medovici pomocí výměšků hltanových žláz, a nechají dozrát v plástech úlu. (Veselý 2009) Včely dále do medu přidávají pyl, který se podílí na biologických vlastnostech medu. Med tak získá všechny biologické vlastnosti z rostlin, od nichž včely sbírají nektar a pyl. (Mejias and Montenegro 2012) Složení medu se také mění v závislosti na druhu včel a lokalitě, kde včely žijí.

Používání přírodního medu jako potraviny a i jako léku, používalo lidstvo v průběhu celé své historie. Archeologické nálezy z horního Egypta z před dynastického období ukázaly, že kočovné kmeny Tasiánské kultury (4500 př. n. l.), užívali med také ke kosmetickým účelům. Další zmínky o medu a včelařství jsou známy ze Saudské Arábie (6000 př. n. l.). Hliněný obraz nalezen v Iráku, líčí med jako lék proti nemocem. (Alqarni, Hannan et al. 2011) Náboženství islámu doporučovalo používání medu jako potraviny, tak i jako lék. (Ajibola, Chamunorwa et al. 2012) Používání medu ke kosmetice je datováno také asi na 3000 let př. n. l. na Sumérských tabulkách a na Ebersových papyrech (1500 let př. n. l.). (Burlando and Cornara 2013) Další starověké zprávy o medu v kosmetice zahrnují spisy od Aristotela, Dioscorida a Plinia, stejně tak proročké knihy jako jsou Bible, Korán, Tóra a Talmud. Římský básník Ovidius popisuje ve svém *Medicamina faciei feminae* (43 př. n. l. až 18 n. l.) různé recepty na pleťové masky obsahující med. (Alqarni, Hannan et al. 2011) Použití



medu v lidové medicíně sahá až 2100-2000 let před Kristem.(Mohamed, Sulaiman et al. 2012)

Pro potravinářské a léčebné užití medu je třeba med definovat. Státní zemědělská a potravinářská inspekce zveřejnila definici medu dle vyhlášky č. 76/2003 Sb., jako potravinu přírodního sacharidového charakteru, do které nesmí být přidány s výjimkou jiného druhu medu, žádné jiné látky včetně přídatných látek.(2013) Med je vodný roztok cukrů, obsahující řadu látek (Manzanares, García et al. 2014), jehož přesné složení je ovlivněno řadou faktorů, jako je zeměpisný původ, botanický zdroj nektaru, environmentální a klimatické podmínky, a také techniky zpracování. Různé druhy medu mohou být seskupeny do jednodruhových nebo více druhových medů. Klasifikace v podstatě závisí na tom, zda dominantní pylové zrno pochází pouze z jednoho konkrétního rostlinného druhu nebo je ve vzorku pyl z více rostlinných druhů.(Mohamed, Sulaiman et al. 2012) Jednodruhových medů je veliké množství, nejznámější jednodruhové medy jsou řepkový, akátový, malinový a jetelový med. Řepkový med je zpravidla znám v krystalické formě, v tekuté formě je jasně žlutý. Chuť řepkového medu není příliš výrazná. Akátový med je žlutý s nazelenalým nádechem, je hutný, má jemné aroma a zůstává v tekutém stavu i několik let. Pohankový med bývá červenohnědý, při krystalizaci, jsou u něj patrné hrubé krystaly klesající ke dnu. Má velmi výrazné aroma a chuť. Vřesový med je červenohnědé barvy, v tekuté formě připomíná konzistencí želé. Jetelové nebo vojtěškové medy jsou světlé, nevtíravé, příjemné chuti a vůně, krystalizují v celé hmotě v jemných krystalech. Slunečnicový med je jasně žlutý a má typickou chuť, má sklon k rychlé krystalizaci. Medovicové medy se výrazně liší od nektarových medů tmavší barvou a pomalejší krystalizací, výjimkou je med s obsahem melecitózy. Při krystalizaci se vytvářejí hrubé krystaly, které se někdy usadí na dně nádoby. Medovicové medy mají harmonickou chuť, což je dáno vyšším obsahem minerálních látek a menší kyselostí. Medy ze smrkové medovice jsou hnědočervené, hnědozelený odstín mají medy z jedle, medy z dubové medovice patří k nejtmaším medům. (Veselý 2009)

Složení medu je pro každý druh různé a specifické. Bylo zjištěno, že med obsahuje přibližně kolem 200 různých bioaktivních látek (Ferreira, Aires et al. 2009) obsažených v sušině a vodu, kdy průměrný obsah vody je 18 % (Belay, Solomon et al. 2013). Hlavními sacharidy tvořící sušinu v medu jsou fruktóza a glukóza, se stejným molekulovým vzorcem, ale různým strukturním vzorcem (ketosa a aldosa), jsou to jednoduché cukry (monosacharidy).(Mohamed, Sulaiman et al. 2012) Dalšími cukry jsou oligosacharidy a to převážně disacharidy (např. maltósa a sacharósa) a trisacharidy (maltotriósa a panósa).

(Kassim, Mansor et al. 2012). Med dále obsahuje další bioaktivní složky, jako jsou fenolické látky, flavonoidy, organické kyseliny, karotenoidy, metabolity oxidu dusnatého (NO), kyselinu askorbovou, aromatické sloučeniny, aminokyseliny, vitamíny (Mohamed, Sulaiman et al. 2012) a minerální látky jako K, Ca, Na a Mg, jež se vyskytují ve větším množství např. v eukalyptovém medu a Fe, Cu, Cr, Zn, P, jež se vyskytují ve stopovém množství.(Freitas, Pacheco et al. 2006) Téměř ve všech medech převažuje fruktóza nad glukózou, což se projevuje stáčením roviny polarizovaného světla doleva, jsou tedy levotočivé. Medovicové medy mívají méně redukujících cukrů než nektarové, protože obsahují více oligosacharidů.(Veselý 2009) Obsah cukrů a vody je hlavním faktorem ovlivňující míru krystalizace medu. Doba potřebná ke krystalizaci medu závisí především na poměru fruktózy ke glukóze a rychlost krystalizace na poměru glukózy k vodě. (Escuredo, Dobre et al. 2014) Některé druhy medu obsahují kynurenovou kyselinu (metabolit tryptofanu s neuro-aktivní činností), která může přispět k antinociceptivním (proti bolesti) a antimikrobiálním vlastnostem medu. V medu byla nalezena také řada enzymů, jako je oxidáza glukózy, amyláza, invertáza, fosfatáza, kataláza a peroxidáza. Monosacharidy fruktóza a glukóza nemusí být tak hydrolyzovány enzymy gastrointestinálního traktu a proto jsou připraveny k absorpci.(Mohamed, Sulaiman et al. 2012)

Na základě několika experimentálních a klinických poznatků se zjistilo, že účinky medu v gastrointestinálním traktu, mohou v játrech i ve slinivce břišní vést ke zlepšení kontroly glykémie. Obsah fruktózy a oligosacharidu palatinózy (isomaltulósa) v medu, vede ke zpoždění trávení a střevní absorpci glukózy a následně ke snížení glykémie. (Mohamed, Sulaiman et al. 2012) Roku 2004 proběhla studie, která sledovala účinky oligosacharidů v medu jako probiotika na mikroflóru ve střevě myši a její roli v patogenezi obezity a inzulínové rezistence. Studie ukázala zvýšené množství tuku, vyšší glykémie na lačno, inzulínu (příznak inzulínové rezistence) a leptinu u myši s mikroflórou, oproti myším bez mikroflóry.(Mohamed, Sulaiman et al. 2012) Med obsahuje také řadu látek, které plní roli antioxidantů. Výzkumy ukazují, že kvalitativní a kvantitativní složení medu (včetně složky antioxidantů a ostatních fytochemických látek) je dána květinovým zdrojem. (Ajibola, Chamunorwa et al. 2012) Od roku 2003 do roku 2012 proběhly studie, které prokázaly silnou korelaci mezi obsahem fenolických sloučenin a antioxidační kapacitou v medech z různých květinových zdrojů a jejich prospěšných účinků na lidské zdraví. (Kassim, Mansor et al. 2012) Tmavší medy (např. pohankový med) mají obecně vyšší obsah antioxidantů, než světlé medy. Epidemiologické studie, jež analyzovaly zdravotní důsledky antioxidantů z divoce

rostoucích a léčivých rostlin, a běžně konzumovaných potravin, mají rozhodující vliv na zdraví. Vzhledem k chemické rozmanitosti antioxidantních látek přítomných v léčivých rostlinách a funkčních potravinách, nemusí nutně odrážet celkovou antioxidantní kapacitu úrovně jednotlivých antioxidantů, což také závisí na synergických a redoxních interakcích mezi různými molekulami přítomné v rostlinách a potravinách. Vedle kávové a kumarové kyseliny a jejich esterů, med obsahuje fenolické kyseliny a jejich deriváty flavonoidů *aglykony* (pinobanksin, chrisin, galangin, luteolin a kaempferol). (Štajner, Popović et al. 2014) Antioxidanty přítomné v medu jsou enzymatického charakteru (katalasy, glukóza oxidáza, peroxidáza) a charakteru neenzymatického (kyselina askorbová, tokoferol, karotenoidy, aminokyseliny, proteiny, organické kyseliny, produkty Maillardových reakcí, a více než 150 polyfenolických sloučenin, včetně flavonoidů, flavonolů, fenolických kyselin, katechinů a derivátů kyseliny skořicové. (Ferreira, Aires et al. 2009) Výzkumníci v Kalifornii také tvrdili, že lidé mohou být chráněni před škodlivými účinky volných radikálů a reaktivní formou kyslíku přes absorpci antioxidantů z potravin, jako je například med. V rámci studie, kdy bylo podáváno 37 zdravým dospělým lidem pohankový med v množství 1,5 g/kg tělesné hmotnosti, s kukuřičným sirupem jako kontrola, došlo ke zvýšení ( $p < 0,05$ ) celkového fenolického obsahu a antioxidantů v plazmě. Výsledky této studie tak podporují představu, že fenolové antioxidanty ze zpracovaného medu jsou biologicky dostupné, a zvyšují antioxidantní aktivitu plazmy. (Ajibola, Chamunorwa et al. 2012) Výhodou fenolických sloučenin je, že dokážou stabilizovat buněčné membrány snížením peroxidace lipidů a odstraněním volných radikálů, a zároveň zvýší membránovou celistvost proti několika chemickým a fyzikálním stresovým vlivům. Med prokázal silnou aktivitu proti volným radikálům s výrazným potlačením poškození buněk, prokázal úplnou inhibici oxidace buněčné membrány a oživení intracelulárního glutathionu v kultivovaných endoteliálních buňkách. (Kassim, Mansor et al. 2012) S obsahem fenolických sloučenin často koreluje i obsah kyseliny askorbové (vitamín C), který se v medech objevuje ve velkém množství. Kyselina askorbová je považována za silný antioxidant. Byla provedena studie studující obsah kyseliny askorbové v akátovém medu obohacený z výměšků ovoce *Rosa spp.*, která ukázala nejvyšší obsah 248,4 mg/100 g. Vyšší obsah kyseliny askorbové mají obecně více tmavé medy. (Štajner, Popović et al. 2014)

Další vlastností medu je antimikrobiální aktivita. Antibakteriální účinek medu je způsoben vysokým obsahem cukrů a nízkou vodní aktivitou, což inhibuje bakteriální růst. Dále med obsahuje polyfenoly, enzymy např. oxidázu glukósy, který produkuje peroxid vodíku, jenž má také antibakteriální vlastnosti. K antibakteriální aktivitě medu také přispívá

nižší pH (přibližně 4,0). Bylo vydáno několik publikací popisující antibakteriální účinek medu ze stromu Manuka z Nového Zélandu, který vykazuje antibakteriální účinky v *in vitro* podmínkách na lékařsky významných bakteriích rodu *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*.(Schneider, Coyle et al. 2013) Důkaz na podporu potenciální úlohy medu v léčbě žaludečních vředů poskytla studie, která prokázala, že med inhibuje růst *Helicobacter pylori*, hlavní patogen při žaludečních a dvanáctíkových vředech.(Mohamed, Sulaiman et al. 2012) Med vykazuje antibakteriální účinek proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím.(Ajibola, Chamunorwa et al. 2012)

### 3. 1. 2 Propolis

Mezi další tradiční včelí produkty patří *propolis*. Propolis je přírodní produkt produkovaný včelami z pryskyřičné látky získané z pupenů stromů a mízy, smíchaný s vlastními sekrety včel, jako jsou sliny a včelí vosk.(Hata, Tazawa et al. 2012) Je také znám pod názvem „*včelí lepidlo*“ nebo včelí tmel (Gavanji, Larki et al. 2012) nebo smoluňka (Veselý 2009). Včely propolis používají k utěsnění a zalepení děr a prasklin v úlu, k udržení teploty (tepelná izolace), světla a vlhkosti.(Gavanji, Larki et al. 2012) Propolisem včely pokrývají (balzamují) vetřelce, které usmrtily v úlu a nemohou je dostat ven. Ochranná funkce propolisu spočívá také ve vytváření vhodné ochranné atmosféry v úlu. (Veselý 2009) Konzistence propolisu je pevná, silně lepkavá pastovitá hmota (Gavanji, Larki et al. 2012), od světle žluté barvy (Burdock 1998) přes světle a tmavě zelenou, jako je to u Brazílských propolisů, až po tmavě hnědou barvu (Gavanji, Larki et al. 2012). Existuje i Kubánský a Brazílský propolis červené barvy, který včely produkují z červené pryskyřice z *Dalbergia ecastophyllum*.(Tran, Duke et al. 2012)

Využití propolisu sahá do středověku, samotného počátku včelí domestikace (300 př. n. l.), kdy byl propolis pro své vlastnosti používán k léčbě dermatologických onemocnění, k hojení ran, popálenin a revmatismu.(Burdock 1998) Egypťané používali propolis pro jeho protihnilobné a desinfekční vlastnosti a pomazávali s ním mrtvé. Dále byl propolis uznán pro své léčivé vlastnosti řeckými a římskými lékaři Aristotelem, Dioscoridem, Pliniem a Galenem. Tento lék byl používán jako antiseptikum a byl také užíván jako ústní desinfekční prostředek i arabskými lékaři a Inkové používali propolis pro jeho anti horečnaté vlastnosti.

Londýnské letopisy ze 17. století uvádějí propolis jako oficiální lék. (Castaldo and Capasso 2002)

Propolis obsahuje asi 50 % pryskyřice, 30 % včelího vosku, 10 % esenciálních a aromatických olejů (silic), 5 % pylu a 5 % ostatních látek (například mechanických nečistot). (Al-Waili, Al-Ghamdi et al. 2012) Složení propolisu je přímo úměrné množství látek a exsudátů, shromážděné včelami z různých stromů. (Siripatrawan, Vitchayakitti et al. 2013) Chemické složení propolisu tvoří řada bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly (flavonoidové aglykony, fenolické kyseliny a jejich estery, fenolové aldehydy, alkoholy a ketony), kumariny, steroidy, aminokyseliny a anorganické sloučeniny. (Yonar, Yonar et al. 2014) Nejdůležitější aktivní složkou propolisu jsou aromatické kyseliny, fenolické sloučeniny, zejména flavonoidy (flavony, flavonoly a flavonony). Flavonoidy, aromatické kyseliny, diterpenické kyseliny a fenolické sloučeniny jsou hlavními komponenty odpovědné za biologickou aktivitu propolisu. (Siripatrawan, Vitchayakitti et al. 2013) Dále obsahuje pylová zrna, která jsou nositelem esenciálních prvků, jako jsou Mg, Ni, Ca, Fe a Zn. (Castaldo and Capasso 2002) Dále propolis obsahuje vitamíny skupiny B, zpravidla v množstvích kolem 1 ppm, minerální látky a stopové prvky, které mohou výrazně ovlivnit barvu propolisu, protože reagují s flavonoidními barvivy na šedočerné nebo zelenočerné látky. (Veselý 2009) Bylo prokázáno, že tyto látky dávají propolisu řadu vlastností a účinků, například antioxidační, antibakteriální, antivirové, protizánětlivé, protirakovinné, protiplísňové a protinádorové účinky. V důsledku toho, propolis byl a je používán v potravinářských a farmaceutických produktech pro zlepšení zdraví a prevenci nemocí, jako jsou záněty, diabetes mellitus, rakovina, onemocnění a porucha membrány erytrocytů, (Siripatrawan, Vitchayakitti et al. 2013) revmatismus, alergie, astma, srdeční onemocnění, pneumonie, chřipka a žaludeční vředy. (Tran, Duke et al. 2012) Byla provedena studie, která hodnotila účinky propolisu na akutní zánět plic u myši, způsobený cigaretovým kouřem, kdy byly myši vystaveny kouři po dobu pěti dní. Myšim byl podáván propolis v dávkách 200 mg/kg/den. Následně byly pozorovány protizánětlivé a antioxidační reakce a procesy podílející se na zánětu a oxidačním stresu. Výsledky této studie naznačují, že propolis brání zánětu snížením úrovně zánětlivých cytokinů. (Lopes, Ferreira et al. 2013) Antimikrobiální vlastnosti propolisu se přičítají především flavonoidům (pinocembrinu, galanginu a pinobanksinu). Pinocembrin také vykazuje antifungální vlastnosti. Další účinné látky jsou estery kyseliny kumarové a kávové. V roce 2012 proběhla studie zkoumající antimikrobiální účinek propolisu proti mikrobiální kultuře složené ze směsi odolné vůči antibiotikům, a synergismus mezi medem a propolisem

k mikrobiální monokultuře a směsi mikrobů. Byla připravena kultura lidských patogenů skládající z bakterií *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a kvasinky *Candida albicans*. Výsledky studie ukázaly, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) propolisu na Gram pozitivní bakterie je 0,078-1,25 % a proti kvasinkám 0,16-1,25 %, oproti Gram negativním bakteriím s 1,25-5 %. V jiné studii provedené v Portugalsku bylo zjištěno, že *Candida albicans* byla vůči propolisu nejvíce odolná a *Staphylococcus aureus* byl naopak nejcitlivější. V této studii minimální inhibiční koncentrace propolisu proti Gram pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* byl 0,15-0,25 % a proti Gram negativní bakterii *Escherichia coli* byla 0,15 %, u kvasinky *Candida albicans* byla 0,20-0,22%. (Al-Waili, Al-Ghamdi et al. 2012)

Kromě jiných biocidních vlastností, propolisu a jeho extrakty mají virucidní vlastnosti. Amoros et al zkoumali *in vitro* účinek propolisu na několik DNA a RNA virů, kromě jeho vlivu na množení virů, bylo zjištěno, že propolis vyvíjí virucidní působení na obalené viry HSV a VSV. (Burdock 1998)

### 3. 1. 3 Mateří kašička

Dalším významným včelím produktem je *mateří kašička*. Mateří kašička je vylučována hypofaryngálními a mandibulárními žlázami dělnic včel medonosných (*Apis mellifera*) mezi šestým a dvanáctým dnem jejich života a je nezbytným krmivem pro vývoj královny včel.(Morita, Ikeda et al. 2012) Královna včel (matka včel) je krmena mateří kašičkou celé larvální období i po vylíhnutí, zatímco dělnice jsou krmeny mateří kašičkou pouze 3 dny, a proto se zcela nevyvinou.(Ramadan and Al-Ghamdi 2012)

Mateří kašička je látka husté konzistence, která je špatně rozpustná ve vodě. Je bělavé až žluté barvy s mírně štiplavou vůní a nakyslou chutí. Viskozita mateří kašičky se liší v závislosti na obsahu vody. Kyselost se pohybuje v rozmezí od pH 2,5 do 4,8.(Ramadan and Al-Ghamdi 2012) Mateří kašička se skládá hlavně z vody (60 až 70 %), 10 až 16 % cukrů, 12 až 15 % dusíkatých látek, 3 až 6 % tuků, stopy solí, vitamínů a volných aminokyselin.(Buttstedt, Moritz et al. 2013) Z minerálních látek je mateří kašička bohatá na železo, kobalt a zinek, které jsou organicky vázané. Z hlediska sacharidového složení obsahuje mateří kašička tři hlavní cukry a to fruktózu, glukózu a sacharózu, kde glukóza a fruktóza zaujímají 80 % sacharidů. Dále obsahuje cukry jako galaktózu, mannitol, maltózu, maltulózu, turanósu, trehalósu, palatinósu, isomaltózu, melezitósu a maltotriózu.(Daniele and Casabianca 2012) Mateří kašička obsahuje také fenoly, vosky a fenylethylester kyseliny kávové (CAPE).(Izuta, Shimazawa et al. 2009) Bylo prokázáno na zvířatech, že mateří kašička má mnoho farmakologických a výživových účinků, například protinádorové, antioxidační, antibakteriální, působí proti alergiím a má antihypertenzní účinky. Použití přípravku u lidí zlepšuje metabolismus lipoproteinů a snižuje celkový cholesterol a LDL cholesterol v séru.(Morita, Ikeda et al. 2012)

Roku 2009 proběhla studie, která sledovala vliv mateří kašičky a dalších včelích produktů na angiogenezi. Fenylethylester kyseliny kávové obsažený v mateří kašičce je silný a specifický inhibitor aktivace jaderného transkripčního faktoru (NF- $\kappa$ B). Bylo prokázáno, že fenylethylester kyseliny kávové potlačuje indukci prostaglandinu E<sub>2</sub>, syntéza zprostředkována 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetátem a ionofory vápníku. Proto může být fenylethylester kyseliny kávové potenciální antiangiogenní činidlo, které může snížit neovaskularizaci. (Izuta, Shimazawa et al. 2009) Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S), který klesá při normálním stárnutí, může sloužit jako potenciální značka dlouhověkosti a může zlepšit inzulinovou rezistenci. Estradiol (E<sub>2</sub>) je důležitější než testosteron ve vztahu k

inzulinové rezistenci u zdravých mladých žen po menopauze. Baltimore v květnu 2008 v Japonsku provedl randomizovanou, placebem kontrolovanou studii, která hodnotí, jak mateří kašička ovlivňuje biochemii, výživu a glukózovou tolerance. Diabetičtí pacienti se špatnou kontrolou hladiny cukru v krvi byli vyloučeni. Jedinci, kteří se zavázali ke gastrektomii byli také vyřazeni. Do studie bylo zapsáno šedesát jedna zdravých dobrovolníků ve věku 42 až 83 let. Mezi původně přihlášených 61 dobrovolníků celkem 5 dobrovolníků předčasně studii ukončilo. Na konci byly analyzovány obě skupiny, 30 dobrovolníků ve skupině mateří kašičky a 26 dobrovolníků v kontrolní skupině. Výsledky byly téměř stejné, ale skupina mateří kašičky měla hodnoty o pár jednotek nižší například BMI, LDL a HDL cholesterol, systolický a diastolický tlak. (Morita, Ikeda et al. 2012)



## 3. 2 Možné rizikové faktory v medu

Jelikož má med botanický původ, je zde možné riziko toxicity medu sekundárními metabolity, těžkými kovy anebo obsahem rezidujících pesticidů v medu kontaminací nektaru vlivem zemědělské činnosti.

### 3. 2. 1 Pesticidy v medu

Pesticidy jsou chemické látky, které se užívají v zemědělství k ochraně plodin a rostlin před škůdci, což způsobuje i kontaminaci okolního prostředí. Pesticidy byly zjištěny v různých environmentálních matricích, jako je půda, voda a vzduch. V důsledku toho nese značné riziko kontaminace pesticidy včelí pyl a nektar. Používáním pesticidů po několik desetiletí, dochází k hromadění těchto látek a způsobuje tak otravu pesticidy. (Zhang, Fang et al. 2012) Pesticidy tak přispívají k celkové roční úmrtnosti včel, která je odhadována na 30 až 40 %. (Giroud, Vauchez et al. 2013) Vliv insekticidů používaných v zemědělství, je potenciální hrozbou pro zdravé včel, jenž není zamýšlený a je také příčinou poklesu včelstev. Je známo více než 100 pesticidů, které jsou různě toxické pro včely v závislosti na chemické struktuře. Systémové neonikotinoidy, jako jsou imidakloprid, patří k nejpoužívanějším insekticidům proti škůdcům rostlin. Toto široké spektrum neurotoxinů narušuje nervový systém hmyzu, působením agonisticky na nikotinové receptory (nAChR hmyzu), které jsou membránovými proteiny, jenž vyvolává depolarizaci membrány na nervových synapsích. V roce 1994, byl imidakloprid první z neonicotinoidů, jenž byl schválen pro zemědělské použití jako pesticid. Od té doby se jeho použití výrazně zvýšilo, stejně tak chemicky podobných pesticidů clothianidinu a thiaclopridu. Ve Spojených státech, počet kolonií stále klesá z poválečného maxima téměř z 6 milionů na současných 2,5 milionu kolonií, a pokles byl doprovázen vysokou mírou ročních ztrát kolonií, což bylo v průměru o 30 % v letech 2006 až 2008. Bylo zjištěno, že čmeláci jsou na imidakloprid více citliví, než včely, u nichž je LD 50 pro dávku 4,5 ng pesticidu. (Cresswell, Page et al. 2012) Bylo zjištěno, že čmeláci jsou na imidakloprid více citliví, než včely, u nichž je LD 50 pro dávku 4,5 ng pesticidu. Podle chemického složení, důležité syntetické pesticidy jsou organochlorové, organofosforové, pyrethroid, a karbamát. (Zhang, Fang et al. 2012) Syntetické pesticidy jsou včelami metabolizovány cytochromem monooxygenasy P450. Zejména organofosfátové pesticidy a pyrethroidy jsou pro včely velmi toxické, i když se jejich toxicita liší v závislosti na

konkrétním pesticidu.(Johnson, Mao et al. 2012) V roce 2012 v Kolumbii proběhla studie, která stanovila rezidua pesticidů ve včelích produktech. Bylo zjištěno, že 11 % včelařů používá řadu pesticidů, jimiž chrání včely před onemocněním *Varroa*, jako např. s-fluvalinát, flumethrin, aldicarb, atrazin, karbofuran, mancozeb, propamocarb, thiametoxan a glyfosát. Dále byl v medu ze Severní Kolumbie objeven insekticid profenofos, jenž je vysoce toxický pro včely a druhý nejvíce objevený pesticid v medu (0,005 mg/kg). Nicméně, tato molekula byla detekována pouze ve vzorcích ze Severní Kolumbie, kde se pěstuje bavlna.(López, Ahumada et al. 2014)

### 3. 2. 2 Toxické látky pyrrolizidinové alkaloidy

Pyrrolizidinové alkaloidy (PA) jsou toxické sekundární rostlinné sloučeniny, sloužící k obraně rostliny. Zahrnují asi 400 struktur izolovaných od více než 560 rostlinných druhů. Pyrrolizidinové alkaloidy jsou estery alkaloidů složené z necinové báze esterifikované do jedné nebo více necikových kyselin s ohledem na chemosystematickou a biogenetickou analýzu, téměř všechny pyrrolizidinové alkaloidy lze rozdělit do pěti různých strukturálních typů. Co se týče výskytu pyrrolizidinových alkaloidů, vyskytují se pouze u krytosemenných rostlin a vyskytují se pouze u čtyř čeledí: Asteraceae (Senecioneae a Eupatorieae), Boraginaceae, Apocynaceae a rod *Crotalaria* v rámci Fabaceae. (Kempf, Heil et al. 2010) Z těchto skupin je známo 350 různých struktur. Dohromady je komplexní C10-neciková kyselina, zahrnující dvě C5-sloučeniny (odvozené z aminokyseliny izoleucinu a méně často z leucinu). Dále může být strukturální typ biosynteticky upraven do ortonecinového typu pyrrolizidinového alkaloidu. Související je skupina triangularinových PA s jejich otevřeně připoutanými C5-kyselinami diesterové struktury. Triangularinové PA se nacházejí v mnoha druzích Boraginaceae a Senecioneae, ale nikdy neexistují souběžně se senecioninovým typem PA. Další pyrrolizidinové alkaloidy jsou monocrotalinového typu, skládající se z 11 makrocyclických diesterových struktur. Výskyt těchto PA je omezen na rod *Crotalaria* a několik druhů Boraginaceae. Další velmi různorodou skupinou mono- a triesterů pyrrolizidinových alkaloidů je lycopsaminový typ. V tomto případě je necinová báze esterifikována na C-9 s C-7 necikovou kyselinou odvozenou od 2 - izopropylbutylové kyseliny. PA lycopsaminového typu se nacházejí v Eupatorieae (Asteraceae), Boraginaceae a Apocynaceae. Hlavní část známých PA patří k těmto strukturálním typům a často mají dvě společné věci: 1) bazální necin, který je často složen z 1, 2- nenasyceného retronecinu a 2) PA v rostlinách jsou v odpovídajících N-oxidech. Oproti tomu, se navíc ojediněle PA vyskytují i v jiných čeledích, jež je strukturální falenopsinový typ PA, který je spojen s páteřní strukturou nasyceného necinu. (Kempf, Heil et al. 2010) Pro PA vyskytující se v Asteraceae, Boraginaceae a Fabaceae je prokázáno, že primární PA jsou syntetizovány terciárními PA a jsou většinou přeměněny na jejich odpovídající N-oxidy, např. N-oxidace senecioninu na senecionin N-oxid. (Reinhard, Janke et al. 2009) V Etiopii proběhla studie, jež se zabývala obsahem PA v rostlinných rodech *Cacalia*, *Crassocephalum*, *Emilia* a *Senecio*, jež všechny patří do kmene Senecioneae. Bylo zjištěno, že květy *S. angulatus* obsahují retrosin a senecionin. Retrosin je obsažen z 82,8 %, zatímco senecionin 17,2 % z celkového obsahu PA v 0,13 % hmotnosti sušiny. Tyto strukturně podobné alkaloidy jsou založeny na základě

necinu retronecin (nenasyčený v 1, 2 poloze) a oba mají 12 ti členný makrocyklický diester jako necikové části, který je odvozen z isoleucinu. Jediné PA nalezené v detekovatelných hladinách v alkaloidním extraktu z listů *S. angulatus* byly dva makrocykly senecionine a integerrimine . Tyto alkaloidy jsou isomerní, jsou také založeny na retronecine.(Asres, Sporer et al. 2008)

Množství PA v semenech nebo rostlinných fragmentech plevelů rostoucích plodin obsahují pod 50 přes více než 6000 µg PA/kg bylin. Bylo zjištěno, že listy *Borago officinalis* (brutnáku), který se používá jako koření a ingredience do salátů a polévek, obsahují méně než 10mg PA/kg bylin. Listy nebo kořeny kostivalu (*Symphytum officinale*), mohou být použity v bylinných čajích nebo jako zelenina (například v salátech) i když je nevhodný, jelikož kostival obsahuje několik PA, včetně echimidin a lasiocarpin. Obsah PA v listech *S. officinale* se pohybuje od 20 do 1800 mg PA/kg a kořeny *S. officinale* obsahují 2500 až 2900 mg PA/kg. Dále bylo zjištěno, že květy a listy *S. vulgaris* v salátové směsi obsahovali 1,7 % PA.(Koleva, van Beek et al. 2012)

U plevelu *Chromolaena ortodata* z čeledi Asteraceae, jenž se rozšířil z původní Severní Ameriky do Asie a Afriky, byly provedeny chemické analýzy na PA. Bylo objeveno pět hojně vyskytujících se alkaloidů (Tab. 1) ve formě N-oxidů. Dominantními alkaloidy v kořenech a květenství jsou riderin a intermedin, reprezentující O-estery necinových bází heliotridinu a retronecinu. Rinderine je doprovázen N -oxidem jeho 3'-O-acetyl esterem, dále O'-estery retonecinu s kyselinou andělskou obsaženy v kořenech. Poměrně vysoké koncentrace PA v kvítkách *Chromolaena* naznačuje výskyt PA v nektaru, což je typické pro druhy *Eupatorium* a zdokumentováno pro med ze *Senecio jacoboea* a *Echium plantagineum*. PA byly detekovány také v medu z *Chromolaena* v množství 0,2 nmol/g medu, komerčně dostupný v Thajsku.(Biller, Boppré et al. 1994)

<b>Tab. 1: Obsah PA v Chromolaena Ortodata v %</b>		
Alkaloid	kořeny (%)	květy (%)
7-angeloylretronecin	4 - 5	
9-angeloylretronecin	15 - 21	1 - 2
intermedin	26 - 33	4 - 9
rinderin	45 - 49	76 - 88
3'-acetylrinderin	1 - 4	7 - 12

(Biller, Boppré et al. 1994)

### 3. 2. 2. 1 Pyrrolizidinové alkaloidy a jejich obsah v nektarech a pylích

PA, jsou produkovány rostlinami jako sekundární metabolity pro ochranu proti herbivorům. Sekundární metabolity nejsou omezeny pouze na distribuci listů, ale jsou také v květinovém nektaru rostlin. Tento tzv. toxický nektar je paradox vzhledem k tomu, že květinový nektar je obvykle interpretován jako atraktivní, tzn., není odstrašující pro opylovače.(Manson, Otterstatter et al. 2010)

Sekundární metabolity, včetně taninů, fenolů, alkaloidů a terpenů, které byly nalezeny v květinovém nektaru v 21 rodin krytosemenných rostlin. Prevalence a rozmanitost sekundárních sloučenin u krytosemenných rostlin naznačují, že sekundární metabolity v nektaru mají nějaké adaptivní funkce pro rostliny. Předpokládané funkce sekundárních metabolitů v nektaru patří odstrašování kleptoparazitů od nektaru, zvýšená stálost efektivních opylovačů, nebo ochrana proti škodlivým mikrobům. Ačkoliv mnoho sekundárních metabolitů mají mikrobicidní vlastnosti, a různé mikroorganismy se často vyskytují v květinovém nektaru, bylo provedeno několik málo studií, zda nektar se sekundárními metabolity vlastně potlačuje mikroby nebo ne.(Manson, Otterstatter et al. 2010) Na základě těchto domněnek, různé přírodní produkty např. allicin, thymol, citral, geraniol, mastné kyseliny, éterické oleje nebo včelí produkty byly dříve zkoumány v řadě studií, zda vykazují růst inhibičních účinků proti několika onemocnění plodu včel, včetně moru včelího plodu (AFB).(Flesar, Havlik et al. 2010)

Bylo odhadováno, že asi 3% všech kvetoucích rostlin (více než 6000 druhů rostlin) obsahují PA, které se mohou objevit v medu a pylu. Většinou patří do různých druhů čeledě Boraginaceae (např. *Heliotropium*, *Echium*, *Myosotis*, *Borago*, *Cynoglossum*), Asteraceae (např. *Senecio*, *Eupatorium*, *Chromolaena*, *Ageratum*) a Fabaceae (např. *Crotalaria*). Některé z těchto rostlin (např. druh *Echium*) jsou záměrně použity pro produkci medu, takže není překvapením, že byly PA zjištěny v medu a pylu, jež shromažďují včely medonosné.(Dubecke, Beckh et al. 2011) Vyšší obsah pyrrolizidinových N-oxidů a PA byl zjištěn v pylích než v nektarech, jejich obsah se pohybuje v rozmezí od 6 do 14000  $\mu\text{g}$  PA/g pylu. Studie, jež zkoumala obsah PA v pylu u rostlin *Senecio jacobaea*, *S. vernalis*, *Echium vulgare*. Byl analyzován vzorek květinového pylu *S. vernalis* dvěma metodami, jejichž výsledky byly 4,05 mg/g  $\pm$  SD 0,15 pro první metodu a 3,96 mg/g  $\pm$  SD 0,42 (senecioninové ekvivalenty) pro druhou metodu. (Kempf, Heil et al. 2010) Dále byl zkoumán pyl *Echium*

vulgare a *Senecio jacobaea* pro obsah PA, u nichž byl zjištěn obsah PA až 14 mg PA/g pylu u *Echium vulgare* a 0,8 mg PA/g pylu pro *Senecio jacobaea*. Jelikož je květinový nektar vždy kontaminován pylem, je obtížné určit původní obsah PA v nektaru.(Reinhard, Janke et al. 2009)

### **3. 2. 2 Pyrrolizidinové alkaloidy a jejich záchyty v medu**

První zprávy o medech, které obsahovaly PA, byly publikovány někdy na konci sedmdesátých let a na začátku osmdesátých let ve Spojených státech amerických a v Austrálii. V USA obsahoval med alkaloidy z rostliny *Senecio jacobaea* (Asteraceae) a v Austrálii z rostliny *Echium plantagineum* (Boraginaceae).(Kempf, Heil et al. 2010)

Nejběžnějšími rostlinnými zástupci obsahující PA jsou *Echium* spp., *Senecio* spp., *Eupatorium* spp. and *Borago* spp. V průběhu několika malých studií lze předpokládat, že med obsahující PA vznikl v lokalitě se zvýšeným výskytem rostlin obsahující PA v nektaru nebo pylu.(Kempf, Heil et al. 2010) Od roku 2002, vzrostly obavy o přítomnosti PA v potravinovém řetězci. Pokud jde o celkovou situaci na trhu, proběhly dvě podobné studie: na jedné straně od orgánu kontroly potravin v Nizozemí, a na druhé straně nedávno zveřejněná studie podle Kempf et al. Obě studie mají společné, že nebyly analyzovány specificky podezřelé medy z regionů s vysokým podílem rostlin s PA nebo medy s vysokou úrovní pylových PA, ale velké množství náhodně vybraných maloobchodních vzorků.(Kempf, Heil et al. 2010)

Obě studie se však zásadně liší v použitých metodách. Zatímco v Kempf převedl toxikologicky relevantní 1, 2 - nenasycené PA a jejich N-oxidy na jediný souhrnný parametr a prokázal mez stanovitelnosti (LOQ) o 0,01 ppm. Holandský aplikovaný LC-MS přístup je citlivější (LOQ:0,001 ppm), ale vzhledem k nedostatku dostupných referenčních PA, byla studie omezena na detekci a kvantifikaci osmi PA a tří PA-N-oxidů (hlavně PA od *Senecio* spp.). Pokud jde o Kempf et al., bylo 9 % vzorků medu pozitivní na PA (n=216, GC-MS) ve srovnání s 28 % (n=170, LC-MS) s nizozemskou studií. Obsah PA se pohyboval v rozmezí 0,041 - 0,259 mg/g, a průměrný obsah byl přibližně 0,1 mg/g. V kontrastu, nizozemská studie ukázala 0.002-0.365 mg PA na gram medu a průměrný obsah 0,007 mg/g.(Kempf, Reinhard et al. 2010)

Znalosti o výskytu PA v medu vyvolává otázku, zda PA může mít vliv na vývoj včelího medu, anebo na jejich chování při sběru nektaru a opylování květů. (Kempf, Reinhard et al. 2010) PA mohou mít na opylovače (hlavně na včely medonosné) repelentní účinky, mohou je přitahovat, předpokladem mohou být antimikrobiální účinky anebo je odpuzovat. (Gegeer, Manson et al. 2007) Včely pasoucí se na *Senecio jacobaea* (řebříček starček) může obsahovat PA včetně senecioninu, jacobinu, seneciphyllinu, jaconinu, jacolinu a jacozinu až do úrovně 0,3 až 3,9 mg PA/kg medu. Včely pasoucí především na *Echium* spp. obsahují jako hlavní složku alkaloidů echimidin a menší množství dalších PA na úrovních 0,54 – 1,9 mg PA/kg medu. (Koleva, van Beek et al. 2012)

Na základě opylování *Gelsemium sempervirens* (L.), byl proveden laboratorní experiment, ve kterém byl použit jeden z hlavních květinových návštěvníků a opylovačů, čmelák *Bombus impatiens* Cresson, jako modelový systém, aby se prošetřilo, jak ekologický kontext ovlivňuje účinky sekundárních sloučenin v květinovém nektaru na chování opylovačů ve výběru potravy (květiny za minutu a doba vybírání květu). *Gelsemium sempervirens* vylučuje komerčně dostupný alkaloid gelsemin v květinovém nektaru. Předchozí práce ukázaly, že čmeláci (*Bombus bimaculatus*) stráví méně času na květinách *G. sempervirens* a navštíví méně květin na zařízení, pokud je nárůst koncentrací gelseminu v nektaru, což naznačuje, že gelseminový nektar ukládá ekologické náklady na rostliny tím, že změní vizitace čmeláků. Určovalo se chování, reakce čmeláků na květinový nektar bohatý na gelsemin, sledovalo se výběrové chování, rychlost pastvy a čas strávený na květině volně létavých včel na umělých květinových polích, které simulovaly následující ekologicky relevantní scénáře: 1) *G. sempervirens* vyskytující se a kvetoucí se stejně obohacujícími rostlinnými druhy bez obsahu alkaloidů v květinové nektaru, 2) *G. sempervirens* vyskytující se a kvetoucí s méně výnosnými rostlinnými druhy s květinovým nektarem bez alkaloidů, a 3) *G. sempervirens*, ve kterém rostliny mají buď nízkou nebo vysokou úroveň gelseminu v květinovém nektaru. Čmeláci ukázaly preferenci v nektaru s nízkým obsahem gelseminu anebo pro nektar bez alkaloidu, zatímco včely příliš nerozlišovaly nektar s alkaloidem nebo bez něj. Menší preference včel, byla pro nektar s nižším množstvím gelseminu, ale zajímavé bylo, že 10 % včel ukázalo přednost květin s vyšší koncentrací gelseminového nektaru, důvod není zatím prostudován. (Gegeer, Manson et al. 2007)

### 3. 2. 2. 3 Pyrrolizidinové alkaloidy a toxicita u lidí

Ve vztahu ke strukturálním funkcím 1, 2 nenasycených PA, vykazují menší či větší toxicitu. Většinou je třeba rozlišovat toxicitu akutní, chronickou a genotoxicitu. Předpokladem toxicity PA, je dvojitý uhlík v poloze 1,2 necinové báze. Navíc je nutné, aby byla esterová funkce v poloze C-7 nebo C-9 anebo obou pozicích. Pokud jsou tyto požadavky splněny, mohou tyto PA struktury podrobit biotransformaci, především jaterních cytochromů monooxygenás P-450, do odpovídajících dehydropyrrolizidinových alkaloidů (pyrrolů), na nich silně závisí toxicita alkaloidu. Tyto pyrroly jsou vysoce elektrofilní sloučeniny, které snadno a nevratně reagují s nukleofilními buněčnými komponenty, jako proteiny, DNA nebo aminokyseliny a mohou způsobit poškození jater (Kempf, Reinhard et al. 2010) a jsou v podezření, že způsobují rakovinu.(Dubecke, Beckh et al. 2011) Rozsah pozorované toxicity závisí zásadně na struktuře a výsledné metabolické cestě a detoxikačním stupni. Rozdíly v akutní toxicitě v korelaci s esterifikací obou hydroxylových funkčností necinové báze a další přítomností a, b-dvojných vazby v kyselé konstrukci z esteru PA. PA expozice za delší dobu jsou známá především k poškození jater, plic nebo krevních cév, méně prokázané poškození ledvin, gastrointestinálního traktu, slinivky břišní a kostní dřeně. Může se to projevit v žilních uzávěrech jater a plic, megalocytosou, inhibicí buněčného dělení (mitózy) a jaterní cirhózou. Kromě toho, po metabolické aktivaci, PA ukazují počet genotoxických účinků. Patří mezi ně vazby na DNA a DNA cross linking, mutagenita, teratogenní a karcinogenní účinky.(Kempf, Reinhard et al. 2010) Příznaky akutní otravy PA jsou bolesti břicha, ascites (hydroperitoneum, zřídka také vodnatelnost břišní), nevolnost, zvracení, průjem, otoky a velmi vzácně, žloutenka a horečka. S tím souvisí jaterní veno-okluzivní choroba (VOD) zahrnující obstrukci malých žilek s náhlou hepatomegalií (zvětšení jater), jenž může končit smrtí. Nízké dlouhodobé vystavení PA prostřednictvím příjmu potravy vede k chronické VOD vedoucí k cirhóze jater. Ostatní orgány mohou být ovlivněny také, jako plíce (plicní hypertenze) a kardiovaskulární systém (srdeční hypertrofie pravé komory). Světová zdravotnická organizace (WHO), uvedla za nejnižší příjem PA, které způsobuje nepříznivé účinky na člověka, je 0,015 mg/kg tělesné hmotnosti/den, což odpovídá 0,9 mg/den pro 60 kg člověka, který používal kostival po dobu 4 až 6 měsíců. PA vyvíjejí fetotoxické a teratogenní účinky ve vyšších dávkách. Obrázek 2 uvádí přehled hlavních metabolických drah PA. Hydrolýza esteru a N - oxidace představují detoxikační procesy. K bioaktivaci dochází prostřednictvím dehydrogenace pyrrolizidinového jádra k vytvoření dehydro- alkaloidů (pyrrolové deriváty), následuje kyselinou katalyzované štěpení C7 – O vazby, což vede k tvorbě karbokationtu, který může reagovat s dostupnými



nukleofily jako je DNA, což vede v konečném důsledku k jaterní nekróze a nádorům. (Koleva, van Beek et al. 2012) Na rozdíl od antibiotik a pesticidů, PA jsou čistě přírodního původu. (Dubecke, Beckh et al. 2011)

Významnou hrozbou je přímé použití prostředků obsahující PA v tradiční medicíně. V minulosti byla opakovaně pozorována sekundární kontaminace potravin PA. V potravinách živočišného původu, jsou PA předávány prostřednictvím krmiva a hostitelského organismu do potravin určených k lidské spotřebě, jako například vejce nebo mléko. Těžké intoxikace byly popsány na několika příležitostech pro obilí kontaminovaného osiva rostlin PA nebo částí rostlin s PA. PA byly opakovaně zjištěny v krabicích balených salátů (*Eruca sativa*, s rukolou). V srpnu 2009, vedl objev ke krátkodobému zákazu prodeje rukoly v německých řetězcích supermarketů. (Kempf, Reinhard et al. 2010) V Německu je seznam prodejních rostlin a perorální příjem 1,2 - nenasycených PA nesmí být vyšší než 1 mg za den, v případě, že je spotřeba větší, než šesti týdenní limit je limit snížen na 0,1 mg denně. (Martinello, Cristofoli et al. 2014)

### 3. 2. 2. 4 Ostatní toxické nektary

Kromě pyrrolizidinových alkaloidů se v nektarech objevují i další toxické látky např. jiné sekundární metabolity, jako jsou alkaloidy, dále těžké kovy a mykotoxiny. Sekundární metabolity vyskytující se v květech, v nektaru a pylu mohou sloužit k dvojitému účelu, k obraně proti herbivorům a kleptoparazitům, anebo k lákání opylovačů.

Norditerpenové alkaloidy, jež jsou dominantními sekundárními metabolity v *Delphinium* (stračka), jsou rozděleny do dvou tříd: methylenedioxylycoctoninový (MDL - typ) a N-methylsuccinimidový typ a anthranoyllycoctoninový typ (MSAL-type). Alkaloidy MSAL typu jsou výrazně toxičtější pro herbivory, jako jsou *Spodoptera Eridania* a *Musca domestica*. Obsah norditerpenových alkaloidů v *Delphinium* zkoumala studie, jež se zabývala identifikací alkaloidů a jejich koncentrací ve vegetačních orgánech a v květinovém nektaru a pylu. Obsah alkaloidů se lišil v závislosti na lokalizaci, jež byl alkaloid izolován, největší obsah alkaloidů mělo ovoce 3867 ± 315 µg celkových alkaloidů/100 mg. Nejméně zatížený na alkaloidy byl nektar, jehož obsah je 189 krát nižší, než obsah v pylu. Koncentrace alkaloidů v nektaru byla 1,7 ± 0,4 µg celkových alkaloidů/100 mg. Účinky alkaloidů na včely se lišil v závislosti na koncentraci. Výsledky studie naznačují, že včely vykazovaly

vysokou úroveň aktivity, pozorované u včel, jenž byly krmeny kontrolním roztokem a nektarem obohacený o 0,1 mg/ml deltalinu a MLA, a včely, u nichž byla pozorována snížená nebo nízká úroveň aktivity, byly krmeny nektarem obohacený o 1, 2 a 4 mg/ml deltalinu nebo MLA.(Cook, Manson et al. 2013)

Dalším sekundárním metabolitem, jenž byl v nektaru a medu detektován, byl *amygdalin*. Amygdalin je kyanogenní glykosid, jenž byl nalezen v nektarech mandlovníku *Amygdalus communis L.* z čeledi Rosaceae. V pylu mandlovníku byly objeveny extrémní hodnoty amygdalinu o koncentraci 1889 ppm, zatímco v nektaru byla průměrná koncentrace nižší (5,7 ppm). Je možné, že obsah amygdalinu v nektaru, pochází z pylových zrn, jež klesla do nektaru. Byly provedeny experimenty, které sledovali preferenci nektaru včelami, jež obsahovali amygdalin o koncentracích od 1 – 10 ppm. Bylo zjištěno, že včely preferovali nektar jiných rostlin, např. hořčice bílé (*Sinapis alba L.*), avšak byly zaznamenány slabé preference nižších koncentrací amygdalinu v období, kdy měli včely menší výběr nektarů. Nebyl zaznamenán smrtelný vliv amygdalinu na včely, ale bylo zjištěno, že včely nechtějí konzumovat nektar s amygdalinem, pokud mají jiné alternativy.(London-Shafir, Shafir et al. 2003)

Další dobře prozkoumaný alkaloid vyskytující se v nektarech je pyridinový alkaloid *nikotin*. Nikotin je přirozeně se vyskytující alkaloid, který je široce distribuován v rostlinné říši, nejčastěji zástupci čeledě *Solanaceae*, který zahrnuje mnoho zemědělských plodin, včetně *Nicotiana tabacum* (tabák). Nikotin je vysoce toxický pro většinu herbivorů prostřednictvím jeho reakcí na acetylcholinové receptory, a tím ovlivňují různé biologické funkce.(Swaileh and Abdulkhaliq 2012) Studie, jež zkoumala chemické ochranné mechanismy druhů *Nicotiana*, naměřila koncentrace nikotinu v nektarech, pohybující se od 0 – 33  $\mu\text{M}$ . Další měření nikotinu přinesla průměrné hodnoty 3 – 42  $\mu\text{M}$  v *N. glauca*, *N. attenuata* a *N. quadrivalvis*, odběr vzorků od různých populací *N. attenuata* ukázal velkou variabilitu koncentrací nikotinu v nektaru, i za skleníkových podmínek. Experiment s kolibříky *Archilochus alexandri* ukázal, že tyto ptáci byli odpuzováni dávkami nikotinu o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , ale ne 25  $\mu\text{M}$  nikotinu. Dále palestinský *Cinnyris oseus*, byl odpuzován pouze 3  $\mu\text{M}$  nikotinu, což je průměrná koncentrace vzorků květů *N. glauca* v Izraeli. Bylo prokázáno, že tolerance nikotinu tří ptačích opylovačů závisí na koncentraci nikotinu a koncentraci cukru v nektarech. Např. strdimilovití (*Cinnyris Talātala*) tolerují nikotin o koncentraci 3  $\mu\text{M}$  v 0,25 M sacharózy, jejichž tolerance se zvyšuje na 40  $\mu\text{M}$  v 1 M

sacharózy, zatímco palestiniští strdimilovití (*Cinnyris oseus*) snášejí nikotin o koncentraci 0,6  $\mu\text{M}$  v 0,63 M sacharózy. (Lerch-Henning and Nicolson 2013)

Studie z roku 2006 zjistila, že vyšší dávky nikotinu (300  $\mu\text{M}$ ) snižuje přežívání larev a u dospělců tlumí přijímání potravy. Kromě svého výskytu v rostlinách, nikotin se používá jako přírodní insekticid v ekologickém zemědělství. Neonikotinoidy, syntetické analogy nikotinu, jsou používány po celém světě jako insekticidy v důsledku jejich vysoké afinitě k hmyzím nikotinovým acetylcholinovým receptorům. Tím rostou obavy ze snížení počtu opylovačů. Köhler et al. provedl studii, kde zkoumal reakce včel na nektar s nikotinem a účinek nikotinu na přežití včelích dělnic. Včely byly vystaveny různým koncentracím nikotinu v sacharidovém roztoku (nektaru) po dobu 21 dní. Nektary obsahovaly nikotin o koncentracích 0, 3, 6, 15, 30, 60 a 300  $\mu\text{M}$ . Jelikož dělnice nebyly zcela odrazeny od nejvyšší koncentrace nikotinu v 0,63 M sacharózy, byl tento proces opakován s třemi dalšími koncentracemi nikotinu (150, 500 a 1000  $\mu\text{M}$ ). Výsledky ukázaly, že včely významně nerozlišovaly potravu bez nikotinu (kontrola) s nízkými koncentracemi nikotinu (0 – 15  $\mu\text{M}$ ). Vyšší koncentrace nikotinu včely odpuzovaly, ale vyšší koncentrace cukrů prodloužily nástup nepříznivých účinků. Znamky odpuzování včel nastalo při koncentraci 30  $\mu\text{M}$  nikotinu zředěný cukerným roztokem (0,15 M;  $P \leq 0,02$ ), avšak největší známky byly patrné při koncentraci 150  $\mu\text{M}$  na největší koncentraci cukru (0,63 M;  $P \leq 0,01$ ). Experimenty ukázaly, že nikotin v nektarech má odstrašující účinky při vysokých koncentracích, ale dospělé včely jsou schopné tolerovat tento alkaloid, když jsou koncentrace cukrů vyšší. Včely volí sběr nektarů s nikotinem, jakmile není jiná alternativa.  $LD_{50}$  nikotinu perorálně v roztoku sacharózy pro dospělé včely je při koncentraci 12 mM, což je mnohem vyšší koncentrace, než v přirozených podmínkách. V této studii byla úmrtnost včel 53 % při koncentraci 300  $\mu\text{M}$ . (Köhler, Pirk et al. 2012)

Další toxické medy jsou medy obsahující mykotoxiny. Mykotoxiny jsou přírodně vyskytující se sekundární metabolity produkované houbami v zemědělském materiálu během skladování. Mykotoxiny jsou silné toxiny mající širokou škálu účinků na zvířata i na lidi, např. cyto-, nefro- a neurotoxické účinky, dále karcinogenní, mutagenní, imunosupresivní a estrogení účinky. Nejdůležitějším a nejčastějším mykotoxinem nacházejícím se v medu, jsou *aflatoxiny* produkované plísní *Aspergillus*. Studie, která proběhla v Palestině, zkoumala obsah aflatoxinů ve 21 vzorcích medu ze čtyř regionů (Severozápadní nížina, Jordánské údolí, Středohoří, Jižní semiaridní oblast). Bylo zjištěno, že všechny vzorky obsahovaly aflatoxiny, jejichž koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0,5 až 22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , se střední hodnotou 12,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Vzorky medu z různých geografických oblastí obsahovaly významně odlišné koncentrace aflatoxinů, s nejvyšší úrovní aflatoxinů ze Severozápadní nížiny a nejnižší ze Semiaridní oblasti. Na tento rozdíl v obsahu aflatoxinů mají vliv klimatické podmínky. Podle předpisů EU, je maximální povolená míra aflatoxinů v sušeném ovoci určené k přímé konzumaci 4 µg/kg. Pouze tři vzorky medu, měly obsah celkových aflatoxinů pod 4 µg/kg a čtyři vzorky měli naopak větší množství celkového obsahu aflatoxinů nad 20 µg/kg. (Swaileh and Abdulkhaliq 2013)

Mykotoxiny obsažené v medu, jsou včelami detoxikovány cytochromem P450 ve včelím medu. Tolerance toxicity je založena na potravinových složkách, jež vyvolají P450 k detoxikaci. Různé sacharidové diety s absencí medu významně snížily schopnost tolerovat přírodní aflatoxiny B<sub>1</sub>, jež neměly výrazný vliv na toxicitu. Detoxifikace aflatoxinu B<sub>1</sub>, nikoliv jeho bioaktivace, je dána koevoluční historií adaptace. Avšak dlouholeté praxe krmení včel sacharózou nebo vysoko fruktózovým kukuřičným sirupem (HFCS), může mít nezamýšlené negativní dopady, jako neschopnost detoxifikace cytochromem P450. Dále bylo zjištěno, že fruktóza v HFCS může být přeměněna na toxický vedlejší produkt 5 - hydroxymethylfurfural, což může způsobit úplavici podobné příznaky a úmrtnost. Studie, jež se zabývala vlivem HFCS naznačuje, že přežití včely krmené HFCS a sacharózou mohou být ohroženy, pokud jsou včely také vystaveny houbovému toxinu aflatoxinu B<sub>1</sub>, pravděpodobně snížením aktivity P450 a výsledným snížením schopnosti tolerovat aflatoxin. Vzhledem k tomu, že včely nejsou schopny indukovat P450 v reakci na ekologicky nevhodná xenobiotika, mohou prostřednictvím pylu a flavonoidů obsažených v medu zvýšit přežití včel. Aflatoxiny a akaricidy, jako t-fluvalinát, jsou metabolizovány P450, kde je patrný potenciál mezi přírodními a syntetickými xenobiotiky. (Johnson, Mao et al. 2012)

Dalším předmětem studií, byl obsah těžkých kovů a jiných kontaminantů objevující se v medech průmyslových oblastí. Vzorky medu z průmyslových oblastí obsahují nejčastěji těžké kovy jako Cd, Pb, Hg, Zn, Cu, Ni a Cr. Bioakumulace toxických kovů v těle a v potravním řetězci způsobuje chronickou toxicitu. Palestinská studie zkoumající obsah těžkých kovů Cd a Pb byly pod detekčním limitem ve všech analyzovaných vzorcích medu. Koncentrace Zn, Cu, Cr a Ni byly pod detekčními limity v 5, 38, 52 a 67 % všech vzorků medu. Jejich koncentrace byly shledány v pořadí Zn > Cu > Cr > Ni. Výsledky palestinského medu ukazují, že lze med považovat za relativně kvalitní výrobek, pokud jde o koncentraci těžkých kovů v porovnání s jinými státy (tab. 2). (Swaileh and Abdulkhaliq 2013)

Země původu	Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Cr
Súdán	2,94 - 58,12	48,6 - 961,00	<0,45	0,000 - 0,100	0,00 - 4,06	<0,10
Španělsko	1,28	2,83	0,04	0,04		
Litva	0,1 - 0,34	0,51 - 5,64	0,01 - 0,02	0,004 - 0,015		
Turecko	0,55 - 0,96	6,24 - 11,50			0,24 - 1,63	0,17 - 0,37
Jordán	3,37 - 34,56	8,00 - 13,25	0,85 - 1,23	0,003 - 5,780		

(Swaileh and Abdulkhaliq 2013)

Další kontaminant nalezený v nektarech a medech byl *selen* (Se). Selen je polokov, který se přirozeně vyskytuje v některých alkalických půdách z břidlicových vkladů prehistorických vnitrozemských moří. Zemědělský odvod vody, rozpouští selen z těchto půd a způsobuje nahromadění selenanu  $SeO_4^{2-}$ , převládající a biologická forma Se. Pyl, který včely nahromadily z rostlin v oblasti uhelných elektráren, obsahoval 14 mg Se/kg. V městské nekontaminované části Polska, včely shromáždily v medu 7,03 mg Se/kg, v Turecku byly naměřeny v medu koncentrace v rozmezí od 38 až 113 µg Se/kg. Med získaný v oblasti s rudami obsahující selen v Coloradu, obsahoval selen o koncentraci 0,73 mg Se/kg. V některých studiích zkoumajících hladiny Se v členovcích se zjistilo, že různí květinoví návštěvníci obsahovali až 75 µg Se/g sušiny, včely obsahovaly 14,8 µg Se/g sušiny a čmeláci obsahovali 251 µg Se/g sušiny. Je zde možný biotransfěr Se z rostliny na opylovače. Toxicita selenu je přičítána jeho podobnosti s obsahem síry. Selen nahrazuje síru v blízkosti aktivního centra v aminokyselinách, takových jako je cystein a methionin. Selen tak může změnit skládání proteinů a narušit metabolismus buněk a změnit tak aktivitu enzymů. Anorganické formy Se mohou také způsobit oxidační stres a poškodit tak DNA. Obsah Se v medu, snižuje životnost kolonie a aktivitu včel.(Hladun, Smith et al. 2012)

Druhým těžkým kovem je *olovo* (Pb). Množství olova uvolněného do životního prostředí se zvýšilo vlivem průmyslového rozvoje, urbanizace a dopravy. Olovo je pro živé organismy jedem, s nepříznivými účinky na zdraví, což způsobuje fyziologické a behaviorální škody, potenciálně i smrt. Nedávné studie ukázaly, že jsou včely užitečné pro monitorování kontaminace životního prostředí. Studie roku 2012 zkoumala míru kontaminace životního prostředí, včetně pylu a medu. Kontaminace olovem pro včely se pohybovala v rozmezí koncentrací od 0,001 do 1,869 µg Pb/g včel, 0,004 až 0,798 µg Pb/g pylu a 0,004 až 0,378 µg Pb/g medu. Vzorke medu tak vykazovaly nejnižší úroveň kontaminace (průměr je 0,047 µg Pb/g a směrodatná odchylka byla 0,057) ve srovnání se vzorky včel (průměr je 0,223 µg Pb/g a směrodatná 0,217) a vzorky pylu (průměr je 0,240 µg Pb/g a směrodatná

odchylka 0,240). Důvodem nejvyšší kontaminace olovem u včel je možná uzpůsoben více zdrojů kontaminace, např. potrava, voda i olovo vyskytující se ve vzduchu. Koncentrace Pb v pylu jsou podobná těm včelím, proto je zde možná atmosférická depozice Pb. Roman roku 2009 ve své studii zjistil, že vzorky pylu získané z lesní zemědělské oblasti a vzorky získané v blízkosti bývalého vojenského letiště obsahovali 0,804  $\mu\text{g Pb/g}$  a vzorky z oblasti letiště obsahovali 0,835  $\mu\text{g Pb/g}$  během prvního roku. V druhém roce vzorky obsahovaly 0,491  $\mu\text{g Pb/g}$  z lesní oblasti a 0,574  $\mu\text{g Pb/g}$  z oblasti letiště. Činnosti, jež probíhaly v bývalém letišti, by mohly vysvětlovat vyšší kontaminaci Pb. Kontaminace Pb je závislá na ročním období a meteorologických podmínkách. Morgano et al. ve své studii dospěli k závěru, že kontaminace pylu Pb je vyšší v období od května do září, kdy se objevují více období sucha. Bez ohledu na kontextu krajiny a doby, byl nejméně kontaminován med, včely se zdají být nejcitlivější, pravděpodobně přímými vztahy k životnímu prostředí.(Lambert, Piroux et al. 2012)

### **3. 3 Ostatní netoxické sekundární metabolity**

Sekundární metabolity, jež byly nalezeny v nektarech a medech měly většinou toxické účinky, je ale i několik sekundárních metabolitů, které mají pouze mírně toxické účinky ale také i látky výhodné a zdraví prospěšné, např. kofein, nebo fenolické látky.

#### **3. 3. 1 Kofein**

Kofein (1, 3, 7 – trimethylxantin) je přírodně se vyskytující sekundární metabolit, jenž patří do skupiny purinových alkaloidů, methylových derivátů xantinu. (Swaileh and Abdulkhaliq 2013) Kofein jako sekundární metabolit, byl objeven přibližně u 10 000 rodů krytosemenných rostlin, např. Coffea, Camellia, Theobroma, Herrania, Cola, Ilex a Paullinia. (Kretschmar and Baumann 1999) Používá se ve vyšších koncentracích v řadě nápojů, jako je káva, čaj a nealkoholických nápojů, např. Coca Cola a jiné energetických nápojích.

##### **3. 3. 1. 1 Kofein a jeho obsah v nektarech**

Studie, která sledovala množství kofeinu, analyzovala kofein u 80 % vzorků medu (17/21 vzorků). Zjištěné koncentrace kofeinu v těchto vzorcích se pohybovaly v rozmezí mezi 94 až 3583  $\mu\text{g}/\text{kg}$  medu, s průměrnou hodnotou 1567  $\mu\text{g}/\text{kg}$  medu. Vysoké koncentrace byly nalezeny ve vzorcích medu ze Severozápadní roviny a údolí Jordán. Tyto oblasti jsou dobře známé pro pěstování citrusových plodů. Většina vzorky medu s koncentrací kofeinu nad 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  medu pocházely ze dvou oblastí bohatých na citrusové stromy. Podle Detzel a Wink, působí kofein v nektarech jako odstrašující prostředek proti hmyzu. Obsah kofeinu v medu byl náhodně objeven při stanovení cizorodých látek v medu. Další vyšetřování ukázalo, že kofein je přítomen v citrusových medech o koncentraci asi 1 až 10  $\text{mg}/\text{kg}$  medu a jeho přítomnost je přírodního původu. Studie Trova et al. objevila přítomnost kofeinu v citrusových medech v rozmezí od 500 až 10 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (2,6 až 52  $\text{nmol}/\text{g}$ ) (Swaileh and Abdulkhaliq 2013). Steward objevil v roce 1985 přítomnost kofeinu v poměrně nízkých koncentracích od 6 do 50 ppm (31 až 258  $\text{nmol}/\text{g}$ ) v listech a květech. Na základě studií bylo zjištěno, že obsah alkaloidů (kofeinu a dalších alkaloidů), se mění v závislosti na květním

vývoji rostliny. Chemická analýza mladých květů a pupenů *Citrus limon* odhalila, že jsou prakticky bez alkaloidů, pupeny obsahovaly před kvetením kofein o koncentraci 166 nmol/g +- 2 SE (střední chyba průměru), během kvetení se obsah alkaloidů zvyšuje, kdy květy obsahovaly kofein o koncentraci 318 nmol/g +- 3 SE. Nektar v květech během kvetení obsahoval kofein v měřitelných koncentracích (průměr je 60 nmol/g +- 2 SE). Kromě ochrany proti kleptoparazitům, jsou purinové alkaloidy dobře studovány na cytokininu podobném efektu kofeinu, jejichž roli může hrát při opylování citrusových rostlin. Bylo zjištěno, že v průměru 64 % pylu nalezené v jednokvětovém citrusovém medu je citrusový pyl, což znamená, že zhruba dvě třetiny z medu pocházejí z citrusového nektaru. Dále bylo prokázáno, že obsah kofeinu v rozsahu 60 až 490 nmol/ml, prochází procesem koncentrace při výrobě medu. Asi 95 % kofeinu je z nektaru odstraněn nebo degradován, tento mechanismus není zatím znám.(Kretschmar and Baumann 1999) Nelze ale vyloučit kontaminaci pylem. Měření koncentrací kofeinu v medech ze Sardinie mají 11 různých botanických původů. Výsledky ukázaly přítomnost kofeinu pouze v citrusových a pomerančových medech s průměrnými koncentracemi 1790 a 4930 µg/kg.(Swaileh and Abdulkhaliq 2013)

### **3. 3. 1. 2 Toxicita kofeinu u lidí**

Kofein se vyskytuje v celé řadě komerčně dostupných produktů, jako jsou energetické nápoje, které mohou být konzumovány s jinými léky. Dále bylo zjištěno, že některé drogy mají hlášené množství kofeinu ve směsi s jinými stimulanty, včetně kokainu a amfetaminu. Tyto kombinace mohou mít vliv na toxicitu těchto stimulantů. Interaktivní účinky vedly k obavám, že kofein může mít akutní účinky, často i dlouhodobé nepříznivé účinky v důsledku spojené s konzumací psychostimulantů. Více než 300 milionů občanů Evropské unie konzumují kofein s denním příjmem v rozmezí od 50 do 150 mg. Úmrtí související s předávkováním kofeinem jsou vzácné a jsou spojeny s perorálními dávkami mezi 3 a 20 g.(Vanattou-Saïfoudine, McNamara et al. 2012)

Klinické rysy pozorované u jedinců, již byli otráveni kofeinem, jsou podobné otravám teofylinem. Typickým znakem otravy z kofeinu je zvracení. Zvracení může být spojeno s bolestí břicha nebo průjmem. Masivní zvracení se může vyskytnout u pacientů s těžkou otravou kofeinu, spojené s hematemézou (zvracení krve). Stimulační respirační účinky kofeinu mohou vést k respirační alkalóze. Kofein je v nízkých dávkách (<200 mg)



neurologickým stimulantem; ve větším množství může vyvolat úzkost a neklid, třes, halucinace a křeče. Methylxanthiny, jako je kofein, jsou beta-2-agonisty receptorů, a proto způsobují intracelulární posun draslíku, který má za následek systémovou hypokalémii a intracelulární hyperkalémii. Tyto účinky mohou vést k nedostatku hořčíku, vápníku, fosforu a k hyperglykémii. Tyto metabolické funkce, zejména hypokalémie, byly hlášeny u osob, které trpí akutní otravou kofeinem v souvislosti s nadměrným požitím nápojů s obsahem kofeinu. Léčba akutní toxicity kofeinu by měla být zaměřena na přítomné klinické příznaky. Vedení akutní toxicity kofeinem je v podstatě podobná vedením akutní toxicity sympatomimetickou rekreační drogou. (Davies, Lee et al. 2012)

## 4. Závěr

Ačkoliv je med využíván pro své blahodárné vlastnosti v lidové medicíně, v současnosti může med být rizikem pro naše zdraví. Vývoje naší civilizace a rozvoj zemědělství přináší s sebou řadu chemických látek, jako pesticidy, jež jsou potenciálním rizikem pro lidské zdraví, ale i zdraví včel. Řada studií ukázala, že včely rozvojem zemědělství a včelařství, přispívají na zvyšujícím se procentu úmrtnosti včelstev, obzvláště v USA, kde roční ztráty dosáhly až několika desítek procent. Včely ztrácejí přidáváním sacharidových náhražek do potravy schopnost detoxikovat případné toxiny v nektarech a medech a proto se procento zvyšuje. Případným řešením problému je apelovat na rozšíření zvyků ekologického zemědělství a snížit tak míru užívání pesticidů.

Dále se v medech objevují různé koncentrace sekundárních metabolitů, jež jsou přirozenou součástí rostlin. Bylo zjištěno, že včely užívají nektary s alkaloidy pro ochranu proti chorobám nebo pro zintenzivnění opylování květin, avšak pouze v nízkých koncentracích. Ve většině případů sekundární metabolity snižovaly efektivitu opylování, pouze ve vysokých dávkách se mortalita zvýšila. Ukázalo se, že při vhodných podmínkách, kdy měly včely na výběr z více alternativ opylování, včely volily nektary bez alkaloidů, nebo nektary s nízkými koncentracemi. Byly vyzkoušeny také vyšší preference květů s větší variabilitou koncentrací alkaloidů.

Posledním faktorem potenciálního nebezpečí jsou nálezy těžkých kovů v medech. Většinou se těžké kovy vyskytují v medech z průmyslových nebo urbanizovaných oblastí, kde dochází vlivem civilizace k znečišťování životního prostředí. Tyto látky se dostávají do nektarů a následně do medu. Řada těchto kovů je vysoce toxická a mají vliv na zdraví včel i lidí. Jejich míru v nektarech lze snížit ekologickými principy, např. snížit výstavbu silnic a zaměřit se na alternativní zdroje energie.

Mírou globalizace se med a jeho toxicita může rozšiřovat, proto komise EU kontroluje bezpečnost medu a jeho dodávku na trh. Řešením pro snížení toxicity medu, je přejít na ekologické zemědělství a omezit vliv průmyslu na životní prostředí.

(2013). [www.szpi.gov.cz](http://www.szpi.gov.cz).

Ajibola, A., et al. (2012). "Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth." Nutrition & Metabolism **9**: 12.

Al-Waili, N., et al. (2012). "Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures." International Journal of Medical Sciences **9**(9): 793-800.

Alqarni, A. S., et al. (2011). "The indigenous honey bees of Saudi Arabia (Hymenoptera, Apidae, Apis mellifera jemenitica Ruttner): Their natural history and role in beekeeping." ZooKeys(134): 83.

Asres, K., et al. (2008). "Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in three Ethiopian Solanecio species." Biochemical Systematics and Ecology **36**(5): 399-407.

Belay, A., et al. (2013). "Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia." Food Chemistry **141**(4): 3386-3392.

Biller, A., et al. (1994). "Pyrrolizidine alkaloids in Chromolaena odorata. Chemical and chemoecological aspects." Phytochemistry **35**(3): 615-619.

Burdock, G. A. (1998). "Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)." Food and Chemical Toxicology **36**(4): 347-363.

Burlando, B. and L. Cornara (2013). "Honey in dermatology and skin care: a review." Journal of cosmetic dermatology **12**(4): 306-313.

Buttstedt, A., et al. (2013). "More than royal food-Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee Apis mellifera." Frontiers in zoology **10**(1): 72.

Castaldo, S. and F. Capasso (2002). "Propolis, an old remedy used in modern medicine." Fitoterapia **73**: S1-S6.

Cook, D., et al. (2013). "Norditerpene alkaloid concentrations in tissues and floral rewards of larkspurs and impacts on pollinators." Biochemical Systematics and Ecology **48**: 123-131.

Cresswell, J. E., et al. (2012). "Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid)." Zoology **115**(6): 365-371.

Daniele, G. and H. Casabianca (2012). "Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples." Food Chemistry **134**(2): 1025-1029.

Davies, S., et al. (2012). "Risk of caffeine toxicity associated with the use of 'legal highs'(novel psychoactive substances)." European journal of clinical pharmacology **68**(4): 435-439.

Dubecke, A., et al. (2011). "Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen." Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment **28**(3): 348-358.

Escuredo, O., et al. (2014). "Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon." Food Chemistry **149**: 84-90.

Ferreira, I. C. F. R., et al. (2009). "Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract." Food Chemistry **114**(4): 1438-1443.

Flesar, J., et al. (2010). "In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees." Veterinary microbiology **145**(1): 129-133.

Freitas, M. C., et al. (2006). "Nutrients and other elements in honey from Azores and mainland Portugal." Journal of radioanalytical and nuclear chemistry **270**(1): 123-130.

Gavanji, S., et al. (2012). "Comparative effects of propolis of honey bee on pathogenic bacteria." Afr J Pharm Pharmacol **6**: 2408-2412.

Gavanji, S., et al. (2012). "Comparative effects of propolis of honey bee on pathogenic bacteria." African Journal of Pharmacy and Pharmacology **6**(32): 2408-2412.

Gegear, R. J., et al. (2007). "Ecological context influences pollinator deterrence by alkaloids in floral nectar." Ecology Letters **10**(5): 375-382.

Giroud, B., et al. (2013). "Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1316**: 53-61.

Hata, T., et al. (2012). "Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels." PloS one **7**(11): e48072.

Hladun, K. R., et al. (2012). "Selenium toxicity to honey bee (*Apis mellifera* L.) pollinators: effects on behaviors and survival." PloS one **7**(4): e34137.

Izuta, H., et al. (2009). "Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells." Bmc Complementary and Alternative Medicine **9**: 10.

Johnson, R. M., et al. (2012). "Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*." PloS one **7**(2): e31051.

Kassim, M., et al. (2012). "Gelum Honey Scavenges Peroxynitrite During the Immune Response." International Journal of Molecular Sciences **13**(9): 12113-12129.

Kempf, M., et al. (2010). "Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products." Molecular nutrition & food research **54**(2): 292-300.

Kempf, M., et al. (2010). "Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required." Molecular nutrition & food research **54**(1): 158-168.

Köhler, A., et al. (2012). "Honeybees and nectar nicotine: deterrence and reduced survival versus potential health benefits." Journal of Insect Physiology **58**(2): 286-292.

Koleva, I. I., et al. (2012). "Alkaloids in the human food chain–Natural occurrence and possible adverse effects." Molecular nutrition & food research **56**(1): 30-52.

Kretschmar, J. and T. Baumann (1999) Science Direct

Kretschmar, J. A. and T. W. Baumann (1999). "Caffeine in Citrus flowers." Phytochemistry **52**(1): 19-23.

Lambert, O., et al. (2012). "Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination." Environmental Pollution **170**: 254-259.

Lerch-Henning, S. and S. W. Nicolson (2013). "Bird pollinators differ in their tolerance of a nectar alkaloid." Journal of Avian Biology **44**(4): 408-416.

London-Shafir, I., et al. (2003). "Amygdalin in almond nectar and pollen–facts and possible roles." Plant Systematics and Evolution **238**(1-4): 87-95.

Lopes, A. A., et al. (2013). "Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke." Bioorganic & medicinal chemistry **21**(24): 7570-7577.

López, D. R., et al. (2014). "Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia." Food Control **37**: 33-40.

Manson, J. S., et al. (2010). "Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees." Oecologia **162**(1): 81-89.

Manzanares, A. B., et al. (2014). "Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain." LWT-Food Science and Technology **55**(2): 572-578.

Martinello, M., et al. (2014). "Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey." Food Control **37**: 146-152.

Mejias, E. and G. Montenegro (2012). "The Antioxidant Activity of Chilean Honey and Bee Pollen Produced in the Llaima Volcano's Zones." Journal of Food Quality **35**(5): 315-322.

Mohamed, M., et al. (2012). "Effect of different doses of Malaysian honey on reproductive parameters in adult male rats." Andrologia **44**(s1): 182-186.

Morita, H., et al. (2012). "Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers." Nutrition Journal **11**: 7.

Ramadan, M. F. and A. Al-Ghamdi (2012). "Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review." Journal of Functional Foods **4**(1): 39-52.

Reinhard, A., et al. (2009). "Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*)." Journal of chemical ecology **35**(9): 1086-1095.

Schneider, M., et al. (2013). "Anti-Microbial Activity and Composition of Manuka and Portobello Honey." Phytotherapy Research **27**(8): 1162-1168.

Siripatrawan, U., et al. (2013). "Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution." International Journal of Food Science and Technology **48**(1): 22-27.

Swaih, K. and A. Abdulkhaliq (2012) Wiley Online Library

Swaihleh, K. M. and A. Abdulkhaliq (2013). "Analysis of aflatoxins, caffeine, nicotine and heavy metals in Palestinian multifloral honey from different geographic regions." Journal of the Science of Food and Agriculture **93**(9): 2116-2120.

Štajner, D., et al. (2014). "Nutritive composition and free radical scavenger activity of honey enriched with of Rosa spp." LWT-Food Science and Technology **55**(1): 408-413.

Tran, V. H., et al. (2012). "Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from Acacia paradoxa." Phytochemistry **81**: 126-132.

Vanattou-Saïfoudine, N., et al. (2012). "Caffeine provokes adverse interactions with 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and related psychostimulants: mechanisms and mediators." British journal of pharmacology **167**(5): 946-959.

Veselý, V. (2009). Včelařství. Praha, Brázda, ISBN 80-209-0320-8.

Yonar, M. E., et al. (2014). "Antioxidant effect of propolis against exposure to chromium in Cyprinus carpio." Environmental toxicology **29**(2): 155-164.

Zhang, L., et al. (2012). "Towards posttranslational modification proteome of royal jelly." Journal of proteomics **75**(17): 5327-5341.