ANA I. STOJANOVIĆ<sup>1</sup>
ALEKSANDRA S. DAKOVIĆ<sup>1</sup>
SRĐAN D. MATIJAŠEVIĆ<sup>1</sup>
GEORGE E. ROTTINGHAUS<sup>2</sup>
ŽIVKO T. SEKULIĆ<sup>1</sup>
TANJA T. STANIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, USA

NAUČNI RAD

620.266.1:661.183.1

# ADSORPCIJA T-2 TOKSINA MINERALNIM ADSORBENTIMA

U ovom radu su prikazani rezultati ispitivanja adsorpcije T-2 toksina na različitim mineralnim adsorbentima, zaolitu-klinoptilolitu kao i na smektitskoj grupi minerala – bentonitu i hektoritu. Polazni uzorci koji su korišćeni u eksperimantima adsorpcije okarakterisani su uobičajenim metodama kojima se određuje kvalitet alumosilikatnih minerala: rendgensko difrakcionom analizom praha (XRPD), određivanjem hemijskog sastava, kao i određivanjem vrste i sadržaja izmenjivih katjona. U preliminarnim eksperimentima (pH 3), po indeksu adsorpcije T-2 toksina (95%), ističe se mineral hektorit, dok je na prirodnom zeolitu i bentonitu, adsorpcija ovog toksina niska (8 i 13%, respektivno). Rezultati adsopcije T-2 toksina na hektoritu, pri različitim masenim odnosima adsorbent: toksin, pokazali su da indeks adsorpcije raste sa porastom sadržaja čvrste faze u suspenziji, kako na pH 3, tako i na pH 7 i 9. Pri promeni pH vrednosti sredine nisu uočene značajnije razlike u adsorpciji T-2 toksina na hektoritu.

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti većeg broja plesni koji u organizam životinja i ljudi najčešće dospevaju putem kontaminirane hrane infestirane sporama, konidija i/ili fragmentima micelijuma. Mikotoksini, najčešće prisutni na našem podneblju su: ohratoksin A, zearalenon, trihoteceni, fumonizini, a u novije vreme i aflatoksini.

Trihoteceni predstavljaju najveću grupu Fusarium mikotoksina. Iako je identifikovan veliki broj trihotecena (oko 170), do sada, samo je nekoliko detektovano iz prirodno kontaminiranih žitarica od kojih skoro svi pripadaju trihotecenima tipa A ili B. Oba tipa su tetraciklični seskviterpeni, karakteristični po dvostrukoj vezi na C-9,10 atomu, promenjivom broju hidroksi grupa i epoksidnom prstenu na C-12,13; po čemu su klasifikovani kao epoksi-trihoteceni. Trihoteceni tipa A imaju jednostruku vezu na C-8 atomu i ovoj grupi pripadaju T-2 i HT-2 toksini, neosolaniol (NEO) i diacetoksiscirpenol (DAS). Tipu B pripada deoksinivalenon (DON), nivalenon (NIV) i njihovi derivati, a karakteristični su po karbonilnoj grupi na C-8 atomu [1]. Na slici 1 prikazana je struktura trihotecena tipa A i tipa B.

T–2 toksin, mikotoksin iz grupe trihotecena tipa A ( $R^1 = -OH$ ,  $R^2 = -OCOCH_3$ ,  $R^3 = -OCOCH_3$ ,  $R^5 = -OOCCH_2CH(CH_3)_2$ ), predstavlja jedan od najtoksičnijih metabolita gljiva iz roda *Fusarium* koji se može naći u prirodnim uslovima. Najčešće se nalazi u žitaricama kao što su pšenica, ječam, ovas, pirinač i kukuruz. Prema toksičnosti T–2 toksin spada u toksične mikotoksine –  $LD_{50}$  (srednja letalna dozadoza koja dovodi do uginuća 50% ispitivanih životinja) > 10 mg/kg. Bez obzira na način unošenja, T–2

Adresa autora: A. Daković, Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Franše d Eperea 86, 11000 Beograd, Srbija E-mail: a.dakovic@itnms.ac.yu

Rad primljen: Decembar 4, 2007.

Rad pruhvaćen: Januar 25, 2008.

Slika 1. Struktura trihotecena tipa A i tipa B Figure 1. Structure of trichothecenes tipe A and tipe B

toksin prouzrokuje anoreksiju, malaksalost i mučninu, umanjenu produktivnost i akutne vaskularne efekte koji dovođe do hipotenzije i šoka [2].

Detoksifikacija selektivnom hemisorpcijom mikotoksina predstavlja savremeni pristup sprečavanja njihovih štetnih efekata na zdravlje životinja [3]. Moderne tehnike dekontaminacije u te svrhe koriste mineralne adsorbente mikotoksina koji se dodaju kao aditivi stočnoj hrani. Detoksifikacija, odnosno sprečavanje negativnih efekata, dešava se *in vivo* putem adsorpcije mikotoksina na molekulskom nivou na površini mineralnog adsorbenta, u digestivnom traktu životinja [4]. Efikasnost adsorpcije različitih mikotoksina na adsorbentima znatno se razlikuje, a uglavnom zavisi od hemijskog sastava, kristalne strukture i fizičkih osobina adsorbenta, kao i od fizičko-hemijskih osobina mikotoksina (polarnost, rastvorljivost, oblik, raspodela naelektisanja, konstanta disocijacije itd.) [5].

Primeri adsorbenata mikotoksina su aktivni ugalj (AC), specijalni polimeri, a najčešće se koriste prirodni alumosilikatni minerali i to: zeoliti – klinoptilolit i smektiti – bentonit [6,7], a u novije vreme i hektorit. Tako, intezivno istraživani adsorbenti, kao što su smektitski mineral – hidratisani natrijum kalcijum alumosilikat (HSCAS) i zeolit – klinoptilolit su veoma efikasni u adsorpciji aflatoksina, dok njihova negativno naelektrisana površina čini ih ne efikasnim u privenciji toksičnih efekata *Fusarium* mikotoksina, kao što su trihoteceni ili zearalenon. Afriyie–Gyawu i

saradnici [8] ispitivali su različite adsorbente zearalenona (AC, kalcijum-montmorilonit, ilit, saponit, sepiolit, Wyoming natrijum-montmorilonit, hektorit, zeolit itd.) i došli do zaključka da je, u in vitro uslovima, AC najefikasniji adsorbent (indeks adsorpcije 99%), dok adsorbent dobijen kombinacijom AC i hektorita (HEC) u masenom odnosu 2:1, ima indeks adsorpcije 69%, a sam hektorit 28%. Zeoliti su tektoalumosilikati koji poseduju beskonačnu trodimenzionu strukturu, dok bentonit pripada grupi slojevitih slikata (smektita). Hektorit je, takođe, mineral iz grupe smektita, formiran od dva tetraedarska sloja sa uklopljenim oktaedarskim slojem. Poseduje permanentno negativno naelektrisanje koje raste pri izomorfnoj supstituciji jona Li<sup>+</sup> jonima Mg<sup>2+</sup>. Negativno naelektrisanje slojeva kompenzovano je hidratisanim izmenjivim katjonima u međuslojevima (uglavnom Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) [9–11]. U naučnoj literaturi nema podataka o adsorpciji T-2 toksina na prirodnim alumosilikatnim mineralima.

Cilj ovog rada je da se ispita adsorpcija T-2 toksina na najčešće primenjivanim adsorbentima: zeolitu – klinoptilolitu i smektitima – montmorilonitu i hektoritu, u *in vitro* uslovima.

#### EKSPERIMENTALNI DEO

Kao polazni materijal u eksperimentu adsorpcije T–2 toksina korišćeni su: prirodni zeolit (nalazište Zlatokop iz okoline Vranjske banje), sa sadržajem klinoptilolita oko 90%, a kao nečistoće prisutni su kvarc i feldspat; bentonitska glina (ležište Šipovo), sa sadržajem minerala montmorilonita oko 90%, dok su prateće komponente kvarc i kalcit; hektorit (Hector California USA), kod kojeg je u sirovini kao dominantan mineral prisutan hektorit, a kao prateća komponenta pojavljuje se kvarc. Uzorci su osušeni na 80 °C i usitnjeni do finoće –63 μm.

T–2 toksin, analitičke čistoće korišćen je u eksperimentima. Za potrebe eksperimenta, T–2 toksin je rastvoren u etanolu i na taj način je dobijen osnovni rastvor koncentracije 1 g/l. Iz osnovnog rastvora pripremljeni su, u elektrolitu, radni rastvori koji su korišćeni u eksperimentima adsorpcije. Kao elektolit korišćen je 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH vrednost elektolita je podešavana sa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ili NaOH.

Tabela 1. Hemijski sastav polaznih uzoraka Table 1. Chemical composition of starting samples

Generalno, eksperimenti adsorpcije T–2 toksina su izvođeni tako što je određenoj zapremini elektrolita, koja sadrži tačno određenu koncentraciju toksina, dodavana određena količina svakog mineralnog adsorbenta. Istovremeno je, za određivanje polazne količine toksina (C<sub>o</sub>) pripremana i nulta proba, koja sadrži istu količinu toksina u elektrolitu bez adsorbenta. Adsorpcione smeše su mešane na magnetnoj mešalici određeno vreme na sobnoj temperaturi. Nakon isteka reakcionog vremena, smeše su centrifugirane i u filtratima određivane su koncentracije neadsorbovanog T-2 toksina (C). Polazne, kao i neadsorbovane koncentracije toksina određivane su tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC). HPLC analiza izvođena je na Hitachi L-7100 pump sa Hitachi L-7200 autosampler i UV detekcijom na Hitachi L-7480 UV spektrofotometru ( $\lambda = 212 \text{ nm}$ ). Brzina protoka mobilne faze (acetonitril:voda = 50:50) je iznosila 1 ml/min. Adsorbovana količina toksina je određivana kao razlika između polazne i neadsorbovane koncentracije toksina u rastvoru.

Naredni eksperimenti adsorpcije T–2 toksina na hektoritu su rađeni tako što su menjani maseni odnosi T–2 toksin–hektorit (1000:1, 200:1, 100:1 i 50:1) na tri različite pH vrednosti rastvora 3, 7 i 9, respektivno, pri koncentraciji T–2 toksina u rastvoru ( $C_0$ ) 10 mg/l.

#### REZULTATI I DISKUSIJA

Kvantitativnom hemijskom analizom određen je hemijski sastav polaznih uzorka–adsorbenata i gubitak mase žarenjem do 900 °C, dobijeni rezultati su dati u tabeli 1.

Metodom sa 1 M NH<sub>4</sub>Cl [12] određena je vrsta, kao i sadržaj osnovnih katjona prisutnih u izmenjivom položaju, dok je ukupan kapacitet katjonske izmene određen kao suma sadržaja izmenjivih katjona (Σ). Rezultati su prikazani u tabeli 2.

Iz tabele 2, može se videti da ukupan kapacitet katjonske izmene (CEC) polaznog uzorka zeolita iznosi 146,0 mmol M<sup>+</sup>/100 g, dominantan jon u izmenjivom položaju je kalcijum, dok su natrijum, kalijum i magnezijum prisutni u znatno manjim količinama. Ukupan kapacitet katjonske izmene bentonita je 93,9 mmol M<sup>+</sup>/100 g, a kao dominantan jon u izmenjivom položaju je kalcijum. Ukupan kapacitet katjonske izmene (CEC) polaznog uzorka hektorita iznosi 89,2

	Sadržaj, %								
	SiO <sub>2</sub>	$Al_2O_3$	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Li <sub>2</sub> O	G.Ž.
Zeolit	64,21	11,48	0,88	4,55	1,45	1,71	1,29	/	14,00
Bentonit	55,36	22,94	3,56	3,58	3,27	0,11	0,32	/	12,31
Hektorit	57,88	0,45	0,04	<0,10	23,62	2,22	0,04	1,46	<b>15,</b> 00

		ĕ	-								
Katjon	Sadržaj izmenjivih katjona, mmol M <sup>+</sup> /100 g										
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li +	Σ					
Zeolit	95,0	13,0	22,0	16,0	/	146,0					
Bentonit	79,0	9,1	3,5	1,9	/	93,9					
TT 14 24	1	0.4	77.4	0.6	1.0	00.0					

Tabela 2. Sadržaj izmenjivih katjona u polaznim uzorcima Table 2. Contents of exchangeable cations in starting samples

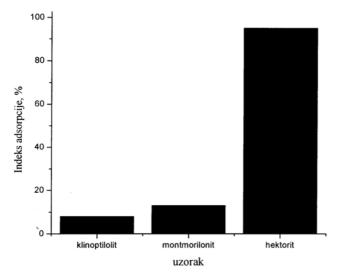
mmol  $M^+/100$  g. Natrijum je dominantan jon u izmenjivom položaju, dok su magnezijum, litijum i kalijum u izmenjivim pozicijama prisutni u veoma malim količinama.

U cilju određivanja da li ovi minerali pokazuju afinitet prema T-2 toksinu, u preliminarnim eksperimentima, adsorpcija T-2 toksina je izvršena na prirodnom zeolitu – klinoptilolitu, kao i na mineralima iz grupe smektita – montmorilonit i hektorit. Indeks adsorpcije T-2 toksina u procentima (%) izračunat je po sledećoj formuli:

Indeks adsorpcije = 
$$\left(\frac{C_o - C}{C_o}\right) \cdot 100$$

gde je:  $C_o$  – polazna koncentracija T–2 toksina, a C – ravnotežna koncentracija T–2 toksina u elektrolitu, nakon adsorpcije. Eksperimenti adsorpcije T–2 toksina su rađeni pri sledećim uslovima: polazna koncentracija T–2 toksina,  $C_o$  = 10 mg/l, maseni odnos adsorbent: toksin – 1000:1, pH elektrolita – 3, vreme kontakta toksin/adsorbent – 30 minuta. Dobijeni rezultati prikazani su grafički na slici 2.

Poznato je da su prirodni zeolit – klinoptilolit, kao i prirodni bentonit – montmorilonit, efektivni adsorbenti mikotoksina aflatoksina B1, u *in vitro* i *in vivo* [13,14]. Takođe, površinskom modifikacijom priro-



Slika 2. Adsorpcija T-2 toksina na različitim mineralnim adsorbentima

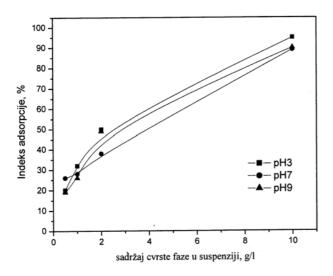
Figure 2. T-2 toxin adsorpton by different mineral adsorbents

dnog klinoptilolita i montmorillonita sa dugolančanim organskim katjonima značajno se povećava adsorpcija mikotoksina – zearalenona i ohratoksina A, u in vitro uslovima [15-17]. Prethodno je pomenuto da u literaturi nisu nađeni podaci o in vitro adsorpciji T-2 toksina na ovim mineralima. Iz rezultata prikazanih na slici 2, može se videti da, pri ovim eksperimentalnim uslovima, prirodni zeolit – klinoptilolit, praktično ne pokazuje afinitet prema T-2 toksinu (kod klinoptilolita indeks adsorpcije T-2 toksina iznosi 8%). Takođe, može se videti da je adsorpcija T-2 toksina na mineralu iz grupe smektita – montmorilonitu niska (indeks adsorpcije 13%). Primećeno je da se po indeksu adsorpcije T-2 toksina ističe mineral hektorit, kod kojeg adsorpcija ovog toksina iznosi 95%. Dobijeni rezultati ukazuju da u hektoritu postoje aktivni centri odgovorni za adsorpciju T-2 toksina. Na osnovu ovih preliminarnih rezultata, naredni eksperimenti adsorpcije T-2 toksina rađeni su na mineralu hektoritu.

Adsorpcija T–2 toksina na hektoritu je dalje ispitivana pri različitim masenim odnosima adsorbent : toksin – 1000:1, 200:1, 100:1 i 50:1. Eksperimenti su rađeni pri polaznoj koncentraciji T–2 toksina,  $C_{\rm o}=10$  mg/l, različitim količinama čvrste faze u suspenziji,  $C_{\rm suspenzije}$ , 10, 2, 1 i 0,5 g/l, na pH vrednosti elektrolita 3, 7 i 9 i za vreme kontakta toksin/adsorbent 30 minuta. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.

Rezultati prikazani na slici 3, pokazuju da kod minerala iz grupe smektita – hektoritu, adsorpcija T–2 toksina raste sa porastom sadržaja čvrste faze u suspenziji (maseni odnos adsorbent : toksin), kako na pH 3, tako i na pH 7 i 9. Tako, pri masenom odnosu 50:1 (polazna koncentracija T–2 toksina 10 mg/l, sadržaj čvrste faze u suspenziji 0,5 g/l), indeks adsorpcije T–2 toksina iznosi 20% na pH 3, 26% na pH 7 i 19% na pH 9, dok sa povećanjem masenog odnosa na 1000:1 (polazna koncentracija T–2 toksina 10 mg/l, sadržaj čvrste faze u suspenziji 10 g/l), indeks adsorpcije T–2 toksina na hektoritu iznosi 95 % na pH 3, 89% na pH 7 i 90% na pH 9.

Porast indeksa adsprpcije T-2 toksina sa povećanjem sadržaja čvrste faze u suspenziji potvrđuje da u mineralu hektoritu postoje aktivni centri odgovorni za adsorpciju T-2 toksina. Dakle, sa povećanjem sadržaja čvrste faze u suspenziji, odnosno sa povećanjem broja aktivnih centara u mineralu raste



Slika 3. Adsorpcija T–2 toksina na hektoritu pri različitim masenim odnosima toksin:adsorbent, na pH 3, 7 i 9. Figure 3. T–2 toxin adsorption by hectorite at different toxin:adsorbent mass ratios, at pH 3, 7 and 9.

adsopcija ovog toksina. Takođe, iz dobijenih rezultata primećuje se da adsorpcija T-2 toksina na hektoritu praktično ne zavisi od pH vrednosti sredine.

# ZAKLJUČAK

Ispitivanjem adsopcije T-2 toksina na prirodnim alumosilikatnim mineralima – zeolitu i smektitima, uočeno je da se po adsorpcionom indeksu T-2 toksina izdvaja mineral hektorit. Rezultati su ukazali da kod ovog minerala postoje aktivni centri odgovorni za adsorpciju T-2 toksina. Efekat količine adsorbenta u rastvoru kao i pH vrednosti na adsorpciju T-2 toksina na hektoritu je pokazao da se sa povećanjem koncentracije adsorbenta u suspenziji povećava i adsorpcioni indeks, na svim ispitivanim pH vrednostima. Takođe uočeno je da promena pH vrednosti rastvora ne dovodi do značajnijih promena u količini adsorbovanog T-2 toksina. Dobijeni rezultati ukazuju da, ukoliko se pokaže efikasan u in vivo uslovima, mineral hektorit bi mogao da nađe praktičnu primenu kao aditiv stočnoj hrani za adsorpciju T-2 toksina.

#### ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat istraživanja na projektu 142057 koji se finansira sredstvima Ministarstva nauke republike Srbije. Eksperimenti adsorpcije T–2 toksina su urađeni u Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, University of Missouri, Columbia, USA.

## LITERATURA

- [1] C. Dall'Asta, S. Sforza, G. Galaverna, J. Chromatogr. A 1054 (2004) 389.
- [2] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amins and Mycotoxins, Lyon, France 9–16 June, 1992, WHO, International Agency for Research on Cancer, 56, 1993, p. 445.
- [3] T.D. Philips, L.F. Kubena, R.B. Harvey, N.D. Heildebauh, Mycotoxin hazards in agriculture: new approach to control, J.Am. Vet. Res. **50** (1989) 416.
- [4] M. Tomašević-Čanović, A. Daković, M. Dumić, O. Vukelić, Nauka Tehnika Bezbednost 2 (1998) 41.
- [5] G. Avantaggiato, M. Solfrizzo, A. Viscoti, Food Addit. Contam. 22 (2005) 379.
- [6] T.D. Phillips, A.B. Sarr, P.G. Grant, Nat. Toxins (1995) 204.
- [7] M. Tomašević-Čanović, M. Dumić, O. Vukićević, P. Radošević, I. Rajić, T. Palić, Acta Vet. 44 (1994) 309.
- [8] E. Afriye-Gyawu, M.C. Wiles, H.J. Huebner, M.B. Richardson, C. Fickey, T.D. Phillips, J. Toxicol. Environ. Health, A 68 (2005) 353.
- [9] R. Grimshaw, The Chemistry and Physics of Clays and Applied Ceramic Materials, Ernest Benn Ltd, London, 1971.
- [10] G. Borchardt, in: J.B. Dixon, S.B. Weed, (Eds.), Minerals and Soil Environments (Chapter 14), Soil Science Society of America, Madison, WI, 1989.
- [11] J. Madejová, J. Bujdák, M. Janek, P. Komadel, Spectrochim. Acta, Part A: 54 (1998) 1397.
- [12] A. Dakovic, M. Tomasevic-Canovic, V. Dondur, D. Stojsic, G. Rottinghaus, in: A. Galarneau, F. Di Renzo, F. Fajula, J. Vedrina (Eds.), Zeolites and Mesoporous Materials at the Dawn of the 21st Century, Proceedings of the 13th International Conference, Montpellier, France, 8–13 July 2001, Stud. Surf. Sci. Catal. 135 (2001) 5276.
- [13] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, V. Dondur, A. Vujaković, P. Radošević, J. Serb. Chem. Soc. 65 (2000) 715.
- [14] P.G. Grant, T.D. Philips, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 599.
- [15] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, G. Rottinghaus, V. Dondur, Z. Mašić, Colloids Surf., B: Biointerfaces 30 (2003) 157.
- [16] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, G. Rottinghaus, V. Dondur, V. Medaković, S. Zarić, Colloids Surf., B: Biointerfaces 46 (2005) 20.
- [17] S.L. Lemke, P.G. Grant and T.D. Philips, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 3789.

## **SUMMARY**

# ADSORPTION OF T-2 TOXIN BY NATURAL MINERAL ADSORBENTS

(Scientific paper)

Ana I. Stojanović<sup>1</sup>, Aleksandra S. Daković<sup>1</sup>, Srđan D. Matijašević<sup>1</sup>, George E. Rottinghaus<sup>2</sup>, Živko T. Sekulić<sup>1</sup>, Tanja T. Stanić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, USA

The contamination of animal feed with mycotoxins represents a worldwide problem leading to economic losses in animal production. According to the Food and Agriculture Organization (FAO), 25% of the world's cereal grain production is contaminated with mycotoxins. The most common mycotoxins found in grains are the aflatoxins, ochratoxins, fumonisins, trichothecenes, zearalenone and the ergopeptine alkaloids. Trichothecenes, constitute the largest group of Fusarium mycotoxins. Among others, T-2 toxin is the most acute toxic trichothecene. In this paper, adsorption of T-2 toxin by natural mineral adsorbents zeolite-clinoptilolite and smectite minerals - bentonite and hectorite, at pH 3 was investigated. The highest adsorption index was achieved for hectorite (95%), while clinoptilolite and bentonite showed low adsorption index for T-2 toxin, 8% and 13%, respectively. Results of T-2 toxin adsorption on hectorite, at different amount of solid phase in suspension, and at pH 3, 7 and 9, showed that toxin adsorption indexes increased with increase of adsorbent concentration in suspension, at all investigated pH values. No significant differences in T-2 toxin adsorption by hectorite, at pH 3, 7 and 9 were observed.

Key words: Mycotoxins • T-2 toxin • Adsorbents • Hectorite • Ključne reči: Mikotoksini • T-2 toksin • Adsorbenti • Hektorit •