

Adsorpcija aflatoksina B₁ na prirodnim alumosilikatima – koncentratu montmorilonita i zeolitu

Marija A. Marković¹, Aleksandra S. Daković¹, George E. Rottinghaus², Mirjana D. Stojanović¹, Vera T. Dondur³, Milan M. Kragović¹, Zvonko P. Gulišija¹

¹Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija

²Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO, USA

³Fakultet za fizičku hemiju, Univezitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Izvod

Adsorpcija aflatoksina B₁ je ispitivana na koncentratu bentonita (montmorilonit) i prirodnom zeolitu – klinoptilolitu, pri polaznoj koncentraciji toksina 4 ppm, pri različitim količinama čvrste faze u suspenziji (1, 0,5, 0,22 i 0,1 g/L) i na različitim pH vrednostima (3, 7 i 9). Rezultati su pokazali da, smanjenje sadržaja čvrste faze u suspenziji dovodi do smanjenja broja aktivnih centara odgovornih za adsorpciju aflatoksina B₁, pa i do izraženijih razlika u adsorpciji ovog toksina na mineralima. Tako, na koncentratu montmorilonita, pri najnižem sadržaju čvrste faze u suspenziji od 0,1 g/L, indeks adsorpcije aflatoksina B₁ iznosi 97% na pH 3, 88% na pH 7 i 82% na pH 9, dok kod prirodnog zeolita adsorpcija aflatoksina B₁ iznosi 9% na pH 3 i 7% na pH 7 i 9. Rezultati prikazani u ovom radu su samo potvrdili činjenicu da upravo razlike u strukturama minerala uslovljavaju različitu efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁.

Ključne reči: mikotoksini, aflatoksin B₁, adsorpcija, klinoptilolit, montmorilonit.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Mikotoksini su sekundarni metaboliti pojedinih vrsta plesni i obično se nalaze na zrnastim hranivima. U organizam životinja dospavaju putem kontaminirane hrane. Oboljenja koja izazivaju mikotoksini nisu kontagiozna, vezana su za hranu i/ili specifična hraniva i ne leče se antibioticima i drugim lekovima [1,2]. Konzumiranje kontaminirane hrane sa niskim sadržajem mikotoksina tokom dužeg vremenskog perioda ima sličan efekat kao i korišćenje hrane sa povećanim sadržajem mikotoksina kraće vreme. Mikotoksini, najčešće prisutni u stočnoj hrani su: aflatoksini, ohratoksini, zearalenon, trihoteceni i fumonizini. Aflatoksinima je ranijih godina uglavnom bila zaražena ljudska i stočna hrana u tropskim i subtropskim područjima. Međutim, poslednjih godina situacija se značajno menja, pa se ovi toksini sve češće nalaze u hrani i hranivima u zemljama Evrope, pa i u Srbiji [3–5].

Aflatoksini su sekundarni metaboliti plesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* [6]. Pogodni substrati na kojima se obično nalaze aflatoksini su kukuruz, pšenica, grašak, suncokret, soja, kikiriki i dr. Nastanku aflatoksina pogoduje relativna vlažnost sredine preko 85%, kao i sadržaj vlage u podlozi od 30%. Optimalna temperatura za proizvodnju aflatoksina je 30–35 °C, dok se pri temperaturama nižim od 13 °C i višim od 42 °C toksini ne stvaraju [7].

Preписка: A. Daković, Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Franše đ' Eperea 86, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: a.dakovic@itnms.ac.rs

Rad primljen: 15. maj, 2015

Rad prihvaćen: 14. oktobar, 2015

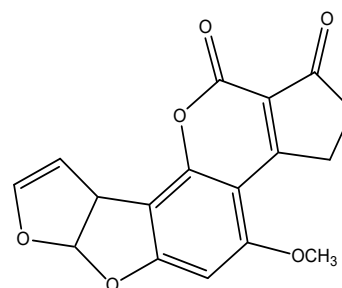
NAUČNI RAD

UDK 66.081.3:582.28:549.67

Hem. Ind. 70 (5) 519–524 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150515058M

Po strukturi aflatoksini su grupa srodnih jedinjenja difurano kumarinskog tipa. Aflatoksini B serije sadrže β-keto laktonske, a aflatoksini G serije, α-bis laktonske funkcionalne grupe. Dobili su naziv prema boji kojom fluoresciraju pod dejstvom UV svetlosti; plava fluorescentna svetlost (blue), odnosno zelena fluorescentna svetlost (green) [8,9]. Od svih do sada poznatih aflatoksina, u pogledu zastupljenosti i toksičnosti, je najvažniji aflatoksin B₁. Toksičnost aflatoksina opada u sledećem nizu: B₁>G₁>B₂>G₂. Strukturna formula molekula aflatoksina B₁ ((6aR,9aS)-2,3,6a,9a-tetrahidro-4-metoksi-1H,11H-cyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopiran-1,11-dion) prikazana je na slici 1.



Slika 1. Strukturna formula aflatoksina B₁.
Figure 1. Structural formulae of aflatoxin B₁.

Aflatoksin B₁ je otkriven pedesetih godina prošlog veka kao izazivač masovnog uginuća ćuraka u Velikoj Britaniji koje su konzumirale kikirikijevu sačmu kontaminiranu ovim toksinom [10]. Od tada, pa do danas ne prestaje interesovanje za ispitivanje uticaja aflatoksina

B₁ na ljude i životinje, tim pre što je aflatoksin prema klasifikaciji Američkog nacionalnog instituta za ispitivanje karcinoma (NRC) svrstan u grupu 1B u koju spadaju dokazani kancerogeni [8,9].

Danas je sasvim sigurno da je i hrana ljudi kontaminirana mikotoksinima, pa odatle i rizik za zdravlje ljudi. Mikotoksikoze se dovode u vezu sa mnogim bolestima: karcinom jetre i aflatoksin B₁, endemska nefropatija i ohratoksin A, karcinom uterusa i zearalenon, itd. [11].

Problem uklanjanja mikotoksina je veoma aktuelan kada je u pitanju ljudska hrana i zdravlje. Dugi niz godina, najekonomičniji pristup u sprečavanju dejstva mikotoksina, odnosno detoksikaciji hrane zagađene mikotoksinima, je baziran na osvajanju novih efikasnih mineralnih adsorbentata koji se dodaju kao aditivi stočnoj hrani u određenoj koncentraciji. Njihova uloga je da adsorbuju mikotoksine u digestivnom traktu životinja i na taj način smanje njihovu biodostupnost, a samim tim i njihovu toksičnost.

Najčešće korišćeni mineralni adsorbenti su prirodni aluminosilikati: prirodni zeoliti (klinoptilolit, mordenit, itd.) i prirodni bentonit (montmorilonit) [12,13]. Zbog razlika u strukturi, različiti minerali imaju različitu efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁. Od bentonitskih gline, najčešće korišćen mineralni adsorbent, koji se pokazao efikasan, u *in vitro* i *in vivo* uslovima, za adsorpciju aflatoksina B₁, je hidratisan natrijum-kalcijum-alumosilikat (hydrated sodium-calcium aluminosilicate – HSCAS – NovaSil™). Bentonitske gline su prirodne mineralne sirovine često mogu da sadrže nepoželjne prateće minerale, često su promenljivog hemijskog i mineraloškog sastava i osobina. To znači da gline različitog kvaliteta mogu da imaju različit afinitet prema aflatoksinu B₁. Na primer, analizom velikog broja (39) komercijalnih proizvoda aditiva stočnoj hrani iz SAD i Meksika, ustanovljeno je kod dvadeset proizvoda dominantno prisustvo smektitiskih gline. Određene su značajne razlike u kvalitetu ovih sirovina, a posredno i značajne razlike u kapacitetu adsorpcije aflatoksina B₁ (i do deset puta). Ispitivanje adsorpcije aflatoksina B₁ na dvadeset smektitiskih gline je pokazalo da samo tri proizvoda imaju visok kapacitet adsorpcije kao – NovaSil™ [14]. Takođe, u radovima u kojima je opisana adsorpcija aflatoksina B₁ na prirodnim zeolitima [15,16], veoma često nema dovoljno podataka o vrsti prirodnog zeolita sa kojim su rađena ispitivanja, kao i o njegovom mineraloškom sastavu. Prirodni zeoliti, kao prirodne nemetalne sirovine su veoma često promenljivog mineraloškog i hemijskog sastava.

Da bi se obezbedila visoka efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁, jedan od uslova je i visok sadržaj osnovnog minerala u proizvodu, pa je u ovim ispitivanjima iz bentonitske gline izdvojen koncentrat montmorilonita i određena je efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁. Rezul-

tati su upoređeni da rezultatima adsorpcije aflatoksina B₁ na prirodnom zeolitu, kod kojeg je dominantan mineral klinoptilolit.

EKSPERIMENTALNI DEO

Kao polazni materijal u eksperimentima adsorpcije aflatoksina B₁ korišćeni su bentonitska gline (ležište Šipovo, Republika Srpska), čiji je osnovni mineral montmorilonit (oko 90%), dok su prateće komponente kvarc i kalcit [17], kao i prirodni zeolit (ležište Zlatokop iz okoline Vranjske banje), čiji je osnovni mineral klinoptilolit (oko 70%), a kao nečistoće su prisutni kvarc i feldspat [18]. Iz rovne sirovine – bentonita, koncentracijom na centrifugi, izdvojen je koncentrat montmorilonita (klasa < 10 μm), dok je kod prirodnog zeolita višestepenim usitnjavanjem i klasiranjem polaznog materijala izdvojena klasa < 63 μm.

Ukupan sadržaj izmenljivih katjona, kako u koncentratu montmorilonita, tako i u prirodnom zeolitu je određen metodom sa 1 M NH₄Cl. Određena količina uzorka (1 g) se ostavi da stoji 24 h u 100 ml rastvora amonijum-hlorida, na pH 7, uz povremeno mućkanje. Posle toga rastvori se centrifugiraju i u filtratima su određeni sadržaji izmenljivih neorganskih katjona (Ca²⁺ i Mg²⁺, Na⁺ i K⁺) na atomskom apsorpcionog spektrofotometru Analytic Jena Spekol 1300.

U eksperimentima adsorpcije je korišćen aflatoksin B₁, analitičke čistoće (proizvođač Sigma–Aldrich). Aflatoksin B₁ je najpre rastvoren u acetonitrilu tako da je dobijen osnovni rastvor koncentracije 1000 ppm. Zatim su iz osnovnog rastvora pripremljeni radni rastvori u odgovarajućem elektrolitu (0.1 M K₂HPO₄; pH elektrolita je podešavan sa HNO₃ ili KOH) koji su korišćeni u eksperimentima adsorpcije.

Preliminarni eksperimenti adsorpcije aflatoksina B₁ su izvođeni tako što je u 10 mL elektrolita koji sadrži tačno određenu koncentraciju toksina (2 ppm), dodavano 100 mg svakog mineralnog adsorbenta. Naredni eksperimenti adsorpcije aflatoksina B₁ na adsorbentima su rađeni tako što su menjane količine čvrste faze u suspenzijama (1, 0,5, 0,2 i 0,1 g/L) na tri različite pH vrednosti rastvora 3, 7 i 9, pri koncentraciji aflatoksina B₁ u rastvoru od 4 ppm. Istovremeno je, za određivanje polazne količine toksina (C₀) pripremana i nulta proba, koja sadrži tačno određenu količinu toksina u elektrolitu bez adsorbenta. Suspenzije su mešane na magnetnoj mešalici određeno vreme (30 min) [12,19] na sobnoj temperaturi. Nakon isteka reakcionog vremena, suspenzije su centrifugirane i u filtratima su određivane koncentracije neadsorbovanog aflatoksina B₁ (C). Polazne, kao i neadsorbovane koncentracije toksina su određivane tečnom hromatografijom viskih performansi (HPLC). HPLC analiza je izvođena na Hitachi L-7100 pump sa Hitachi L-7200 autosampler i fluorescentnim detektorom Hitachi L-7480 (λ_{ex} = 365 nm i

$\lambda_{em} = 430$ nm). Brzina protoka mobilne faze (acetoni-tril: voda – 30:70) iznosila je 1 mL/min. Adsorbirana količina toksina je određivana kao razlika između polazne i neadsorbirane koncentracije toksina u rastvoru [12,17].

REZULTATI I DISKUSIJA

Mineraloški i hemijski sastav, kapacitet katjonske izmene, kao i efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁ su važni parametri koji određuju da li alumosilikatni minerali mogu da se potencijalno koriste kao aditiv stočnoj hrani za adsorpciju mikotoksina [14].

Poznato je da se neorganske forme alumosilikata (klinoptilolit i montmorilonit) najčešće koriste kao adsorbenti aflatoksina B₁, u *in vitro* uslovima. Međutim, zbog razlika u strukturi, očekivano je da ovi minerali imaju različitu efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁. Ukratko, prirodni zeoliti su kristalni hidratizirani alumosilikati, koji poseduju beskonačnu trodimenzionu strukturu sa kanalima i šupljinama. Sa druge strane, montmorilonit, pripada grupi slojevitih alumosilikata. Montmorilonit i klinoptilolit imaju sposobnost jonske izmene katjona, s tim da su izmenljivi katjoni smešteni kod montmorilonita u međuslojnom prostoru, dok se kod klinoptilolita nalaze u kanalima i šupljinama, kao i na spoljašnjoj površini. Očekivano je i da se adsorpcija aflatoksina kod bentonitskih glina može povećati izdvajanjem koncentrata montmorilonita, odnosno povećanjem sadržaja osnovnog minerala. Dostupnost i količina izmenljivih katjona minerala značajno utiču na indeks adsorpcije različitih mikotoksina.

U uzorcima prirodnog zeolita i koncentrata montmorilonita, metodom sa 1 M NH₄Cl je određena vrsta, kao i sadržaj osnovnih izmenljivih katjona, dok je ukupan kapacitet katjonske izmene uzoraka određen kao suma sadržaja izmenljivih katjona (Σ). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Sadržaj izmenljivih katjona (meq/100 g) u koncentratu montmorilonita i prirodnom zeolitu [14]
Table 1. Content of exchangeable cations (meq/100 g) in concentrate of montmorillonite and the natural zeolite [14]

Materijal	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Σ
Koncentrat montmorilonita	65,0	29,2	1,00	1,40	96,6
Prirodni zeolit	85,0	22,5	23,5	15,5	146,5

Tabela 2. Hemijski sastav (%) koncentrata montmorilonita i prirodnog zeolita [14]
Table 2. Chemical composition (%) of concentrate of montmorillonite and the natural zeolite [14]

Materijal	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	Gubitak žarenjem
Koncentrovani montmorilonit	49,3	25,9	5,76	2,59	1,70	0,04	0,33	13,1
Prirodni zeolit	66,6	13,1	2,30	3,85	0,56	1,27	1,17	11,0

Kao što se iz tabele 1 može videti ukupan kapacitet katjonske izmene (KKI) koncentrata montmorilonita je 96,6 meq/100 g, a kao dominantan jon u izmenjivom položaju je prisutan jon kalcijuma. Ukupan kapacitet katjonske izmene uzorka zeolita iznosi 146,5 meq/100 g, pri čemu je dominantan jon u izmenjivom položaju jon kalcijuma [18], dok su natrijum, kalijum i magnezijum prisutni u znatno manjim količinama.

Kvantitativnom hemijskom analizom određen je hemijski sastav uzoraka koncentrata montmorilonita i prirodnog zeolita, kao i gubitak mase žarenjem do 900 °C, i dobijeni rezultati su dati u tabeli 2.

Da bi se odredilo da li uopšte alumosilikatni minerali pokazuju afinitet prema aflatoksinu B₁, u preliminarnim eksperimentima, adsorpcija toksina je ispitana na koncentratu montmorilonita, kao i na prirodnom zeolitu – klinoptilolitu, i pri sledećim uslovima: polazna koncentracija aflatoksina B₁ – 2 ppm, količina čvrste faze u suspenziji – 100 mg/10 mL, pH 3. Indeks adsorpcije toksina u procentima (%) je izračunat po sledećoj formuli:

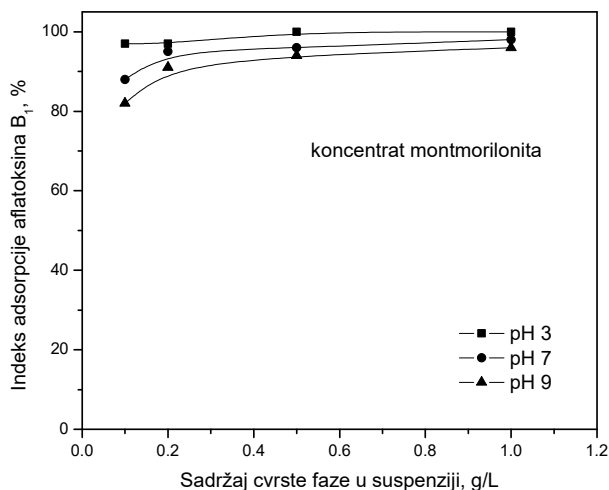
$$\text{Indeks adsorpcije} = 100 \frac{c_0 - c}{c_0} \quad (1)$$

gde je c_0 – polazna koncentracija aflatoksina B₁, a c – ravnotežna koncentracija aflatoksina B₁ u elektrolitu, nakon adsorpcije. Dobijeni rezultati su pokazali da je pri ovim eksperimentalnim uslovima adsorpcija aflatoksina na prirodnom zeolitu, kao i na koncentratu montmorilonita visoka i iznosi 100%.

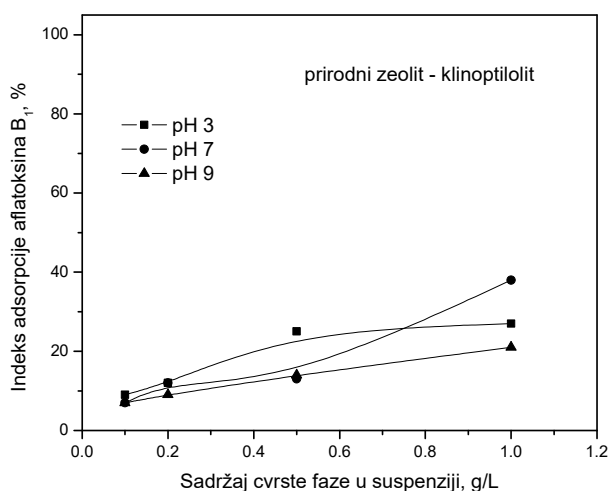
Kod proizvoda koji se nalaze na tržištu, za uklanjanje mikotoksina, kao dokaz visoke adsorpcije mikotoksina, u *in vitro* uslovima, je najčešće prikazan procenat (indeks) adsorpcije (%), tako da je prema deklaraciji, proizvod efikasan ukoliko je indeks adsorpcije 100%. Međutim, kod ovih proizvoda obično nisu definisani uslovi pod kojima je dobijen visok indeks adsorpcije. Na primer, nije definisana početna koncentracija toksina u rastvoru, kao i količina čvrste faze u suspenziji (odnosno odnos toksin:adsorbent) [4], na osnovu kojih bi se procenila efikasnost adsorpcije. Rezultati adsorpcije aflatoksina B₁ na prirodnom zeolitu i koncentratu montmorilonita, pri različitim sadržajima čvrste faze u suspenziji i različitim pH vrednostima, a pri početnoj koncentraciji toksina od 4 ppm, su prikazani na slikama 2 i 3.

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na slikama 2 i 3 mogu se videti jasne razlike u adsorpciji aflatoksina B₁ na mineralima klinoptilolitu i montmorilonitu. Tako,

pri sadržaju čvrste faze u suspenziji od 1 g/L, adsorpcija aflatoksina B₁ na koncentratu montmorilonita iznosi 100% na pH 3, 98% na pH 7 i 96% na pH 9. Na prirodnom zeolitu, pri istom sadržaju čvrste faze u suspenziji, dobijene su znatno niže vrednosti indeksa adsorpcije aflatoksina B₁: 27% na pH 3, 38% na pH 7 i 21% na pH 9.



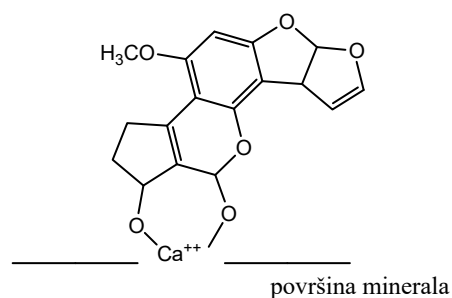
Slika 1. Strukturna formula aflatoksina B₁.
Figure 1. Structural formulae of aflatoxin B₁.



Slika 3. Adsorpcija aflatoksina B₁ na prirodnom zeolitu – klinoptilolitu.
Figure 3. Adsorption of aflatoxin B₁ by the natural zeolite – clinoptilolite.

Smanjenje sadržaja čvrste faze u suspenziji dovodi do smanjenja broja aktivnih centara odgovornih za adsorpciju aflatoksina B₁, pa i do izraženijih razlika u adsorpciji ovog toksina na mineralima. Tako, na koncentratu montmorilonita, pri sadržaju čvrste faze u suspenziji 0,1 g/L, indeks adsorpcije aflatoksina B₁ iznosi 97% na pH 3, 88% na pH 7 i 82% na pH 9, dok kod prirodnog zeolita adsorpcija aflatoksina B₁ iznosi 9% na pH 3 i 7% na pH 7 i 9. Iz dobijenih rezultata, prikazanih na slikama 2 i 3, se takođe primećuje i da adsorpcija aflatoksina B₁

na koncentratu montmorilonita praktično ne zavisi od pH sredine, dok se kod prirodnog zeolita uočavaju male razlike u adsorpciji ovog toksina na različitim pH vrednostima. U literaturi je poznato da su za adsorpciju aflatoksina B₁ odgovorni neorganski katjoni u aluminosilikatnim mineralima. Predhodno je pomenuto, da najčešće korišćen mineralni adsorbent, koji se pokazao efikasan, u *in vitro* i *in vivo* uslovima, za adsorpciju aflatoksina B₁, je hidratisan natrijum kalcijum aluminosilikat (hydrated sodium-calcium aluminosilicate – HSCAS – NovaSil™), koji je u suštini mineral montmorilonit. Phillips i saradnici [20] su prvi predložili mehanizam vezivanja i strukturu mogućeg HSCAS/aflatoxin B₁ helatnog kompleksa (slika 4) na osnovu pretpostavke da metalni joni u HSCAS (na prvom mestu Al³⁺ na ivicama minerala), reaguju sa dikarbonilnim funkcionalnim grupama aflatoksina B₁, obrazujući metalne helate. Dikarbonilni sistem aflatoksina B₁ se sastoji od karbonilnih grupa laktonskog i ciklopentanskog prstena koji može da gradi helatne komplekse sa jonima u mineralima [20,21].



Slika 4. Model kompleksa kation (mineral)/aflatoxin B₁.
Figure 4. Schematic representation of complex cation (mineral)/aflatoxin B₁.

Grant i saradnici [22,23] su ispitivali adsorpciju aflatoksina B₁ na HSCAS i na uzorku, koji je dobijen termičkim tretiranjem HSCAS, označenom kao Col-HSCAS. Col-HSCAS je dobijen zagrevanjem HSCAS na 200 °C 30 min, a zatim je uzorak žaren na 800 °C 1 h. Rezultati su pokazali da rušenjem aluminosilikatne strukture dolazi do značajnog smanjenja adsorpcije aflatoksina B₁, što je ukazalo da je interakcija aflatoksina B₁ sa jonima u međuslojnom prostoru montmorilonita, odlučujuća za njegovu adsorpciju na HSCAS. Kannewischer i saradnici [14] su uradili XRD analizu uzorka smektitne gline pre i nakon adsorpcije aflatoksina B₁ i povrdili da se aflatoxin B₁ adsorbuje uglavnom u međuslojnom prostoru minerala montmorilonita.

I pored toga što prirodni zeolit – klinoptilolit poseduje znatno viši *KKI*, odnosno viši sadržaj neorganskih katjona (na prvom mestu kalcijum) na kojima bi aflatoxin B₁ mogao da se adsorbuje, u odnosu na koncentrat montmorilonita (tabela 2), adsorpcija aflatoksina B₁ na klinoptilolitu je značajno niža. Dobijeni rezultati

potvrđuju rezultate Lemke i saradnika [4] i Marroquin-Cardona i saradnika [24] koji su takođe zapazili znatno nižu adsorpciju aflatoksina B₁ na klinoptilolitu u odnosu na glinu iz grupe smektita – montmorilonit. Na osnovu struktura minerala klinoptilolita i montmorilonita, kao i dimenzija samog molekula aflatoksina B₁, [20] u slučaju prirodnog zeolita očigledno je da aflatoxin B₁ može da se adsorbuje samo na spoljašnjim površinama minerala dok su neorganski katjoni u kanalima nedostupni za adsorpciju. Sa druge strane, u slučaju minerala montmorilonita svi aktivni centri – neorganski katjoni u međuslojnom prostoru su jednako dostupni za adsorpciju ovog toksina, zbog čega ovaj mineral poseduje znatno viši afinitet prema aflatoksinu B₁. Takođe, mineraloška analiza, određivanje hemijskog sastava, kao i kapaciteta katjonske izmene su važni parametri koji definišu kvalitet minerala, pa pre eventualne primene proizvoda kao aditiva stočnoj hrani, neophodno je ispitati njegov kvalitet, odnosno odrediti sadržaj osnovnog minerala i ispitati adsorpciju aflatoksina B₁ u *in vitro* uslovima.

ZAKLJUČAK

U radu su prikazani rezultati adsorpcije aflatoksina B₁ na bentonitskoj glini iz koje je izdvojen koncentrat montmorilonita i prirodnom zeolitu kod kojeg je dominantan mineral klinoptilolit. Rezultati su pokazali da sa smanjenjem sadržaja čvrste faze u suspenziji, razlike u adsorpciji aflatoksina B₁ na ovim mineralima postaju sve izraženije, i da mineral montmorilonit pokazuje značajno višu efikasnost adsorpcije aflatoksina B₁. Adsorpcija aflatoksina B₁ na koncentratu montmorilonita, praktično ne zavisi od pH sredine, dok se kod prirodnog zeolita uočavaju manje razlike u adsorpciji na različitim pH vrednostima. Potvrđeno je da se adsorpcija aflatoksina B₁ na prirodnom zeolitu dešava samo na spoljašnjoj površini minerala, dok su kod koncentrata montmorilonita neorganski katjoni u međuslojnom prostoru odgovorni za adsorpciju, zbog čega koncentrat montmorilonita pokazuje značajno viši afinitet prema aflatoksinu B₁. Za eventualnu primenu alumosilikatnih minerala kao aditiva stočnoj hrani za adsorpciju aflatoksina B₁, neophodno je ispitati kvalitet minerala, odnosno odrediti mineraloški i hemijski sastav (sadržaj osnovnog minerala), kapacitet katjonske izmene, kao i odrediti afinitet minerala prema aflatoksinu B₁.

Zahvalnica

Rad je rezultat istraživanja na projektima 451-03-2802-IP Tip1/142, 172018 i 34013, koji se finansiraju sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Eksperimenti adsorpcije aflatoksina B₁ su urađeni u Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, University of Missouri, Columbia, USA.

LITERATURA

- [1] S. Döll, S. Dänicke, The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Prev. Vet. Med.* **102** (2011) 132–145.
- [2] E.M. Binder, Managing the risk of mycotoxins in modern feed production, *Anim. Feed Sci. Tech.* **133** (2007) 149–166.
- [3] A.C. Pappas, E. Tsiplakou, M. Georgiadou, C. Anagnostopoulos, A.N. Markoglou, K. Liapis, G. Zervas, Bentonite binders in the presence of mycotoxins: Results of *in vitro* preliminary tests and an *in vivo* broiler trial, *Appl. Clay Sci.* **99** (2014) 48–53.
- [4] [4] S.L. Lemke, S.E. Ottinger, K. Mayura, C.L. Ake, K. Pimpkdee, N. Wang, T.D. Phillips, Development of a multi-tiered approach to the *in vitro* prescreening of clay-based enterosorbents, *Anim. Feed Sci. Tech.* **93** (2001) 17–29.
- [5] M. Miraglia, H.J.P. Marvin, G.A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R.W.A. Hutjes, M.Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G.J. van den Born, A. Vespermann, Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe, *Food Chem. Toxicol.* **47** (2009) 1009–1021.
- [6] Y.H. Shi, Z.R. Xu, J.L. Feng, C.Z. Wang, Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks, *Anim. Feed Sci. Tech.* **129** (2006) 138–148.
- [7] J.F. Robens, J.L. Richard, Aflatoxins in animal and human health, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **127** (1992) 69–94.
- [8] IARC Monographs On Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans, Vol. 56, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC, Lyon, 1993.
- [9] S. Rawal, J.E. Kim, R. Coulombe Jr., Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention, *Res. Vet. Sci.* **89** (2010) 325–311.
- [10] M.G. Tenorio Arvide, I. Mulder, A.L. Barrientos Velazquez, J.B. Dixon, Smectite clay adsorption of aflatoxin vs. octahedral composition as indicated by FTIR, *Clays Clay Miner.* **56** (2008) 571–578.
- [11] M.E. Zain, Impact of mycotoxins on humans and animals, *J. Saudi Chem. Soc.* **15** (2011) 129–144.
- [12] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, V. Dondur, G.E. Rottinghaus, V. Medaković, S. Zarić, Adsorption of mycotoxins by organozeolites, *Colloids Surfaces, B* **46** (2005) 20–25.
- [13] Y. Deng, M. Szczerba, Computational evaluation of bonding between aflatoxin B₁ and smectite, *Appl. Clay Sci.* **54** (2011) 26–33.
- [14] I. Kannewischer, M.G. Tenorio Arvide, G.N. White, J.B. Dixon, Smectite clays as adsorbents of aflatoxin B₁: Initial steps, [https://soilcrop.tamu.edu/personnel/dixon/Kannewischer et al 2006.pdf](https://soilcrop.tamu.edu/personnel/dixon/Kannewischer%20et%20al%202006.pdf) (2006).
- [15] N.Q. Thieu, H. Pettersson, *In vitro* evaluation of the capacity of zeolite and bentonite to adsorb aflatoxin B₁ in simulated gastrointestinal fluids, *Mycotoxin Res.* **24** (2008), 124–129.

- [16] M. Nuryono, A. Agus, S. Wedhastri, Y.M.S. Maryudhani, D. Pranowo, Yunianto, E. Razzazi-Fazeli, Adsorption of aflatoxin B₁ in corn on natural zeolite and bentonite, *Indo. J. Chem.* **12** (2012) 279–286.
- [17] A. Daković, S. Matijašević, G.E. Rottinghaus, D.R. Ledoux, P. Butkeraitis, Ž. Sekulić, Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite, *Colloids Surfaces, B* **66** (2008) 20–25.
- [18] M. Kragović, A. Daković, Ž. Sekulić, M. Trgo, M. Ugrina, J. Perić, G. D. Gatta, Removal of lead from aqueous solutions by using the natural and Fe(III)-modified zeolite, *Appl. Surface Sci.* **258** (2012) 3667–3673.
- [19] D.R. Ledoux, G.E. Rottinghaus, *In vitro* and *in vivo* testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs, in: *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium* Nottingham University Press, 1999, pp. 369–379.
- [20] T.D. Phillips, B.A. Sarr, P.G. Grant, Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay, *Nat. Toxins* **3** (1995) 204–213.
- [21] Y. Deng, A.L. Barrientos Velázquez, F. Billes, J.B. Dixon, Bonding mechanisms between aflatoxin B₁ and smectite, *Appl. Clay Sci.* **50** (2010) 92–98.
- [22] P.G. Grant, T.D. Phillips, Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 599–605.
- [23] P.G. Grant, S.L. Lemke, M.R. Dwyer, T.D. Phillips, Modified Langmuir equation for S-shaped and multiseite isotherm plots, *Langmuir* **14** (1998) 4292–4299.
- [24] A. Marroquin-Cardona, Y. Deng, J.F. Taylor, C.T. Hallmark, N.M. Johnson, T.D. Phillips, *In vitro* and *in vivo* characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in Mexico, *Feed Addit. Contam.* **26** (2009) 733–743.

SUMMARY

AFLATOXIN B₁ ADSORPTION BY THE NATURAL ALUMINOSILICATES – CONCENTRATE OF MONTMORILLONITE AND ZEOLITE

Marija A. Marković¹, Aleksandra S. Daković¹, George E. Rottinghaus², Mirjana D. Stojanović¹, Vera T. Dondur³, Milan M. Kragović¹, Zvonko P. Gulišija¹

¹*Institute for Technology of Nuclear and Other Mineral Raw Materials, Franjevačka 86, 11000 Belgrade, Serbia*

²*Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA*

³*University of Belgrade, Faculty of Physical Chemistry, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

Aflatoxin B₁ adsorption by the concentrate of bentonite clay – montmorillonite and the natural zeolite – clinoptilolite and was investigated at the initial toxin concentration of 4 ppm, with different amounts of solid phase in suspension (1, 0.5, 0.2 and 0.1 g/L) and different pH values – 3, 7 and 9. Results indicated that for both minerals, decreasing the amount of solid phase in suspension, decrease the amount of active sites relevant for adsorption of aflatoxin B₁. Thus, for concentrate of montmorillonite, at the lowest level of solid phase in suspension (0.1 g/L), aflatoxin B₁ adsorption indexes were 97% at pH 3, 88% at pH 7 and 82% at pH 9, while for the natural zeolite, adsorption of toxin was 9% at pH 3 and 7% at pH 7 and 9. Since inorganic cations in minerals are mainly responsible for aflatoxin B₁ adsorption, even the natural zeolite – clinoptilolite has much higher cation exchange capacity (the content of inorganic exchangeable cations) compared to the concentrate of montmorillonite, adsorption of aflatoxin B₁ by this mineral is much lower. Comparing the molecular dimensions of aflatoxin B₁ molecule with the dimension of channels of clinoptilolite and interlamellar space of montmorillonite it is obvious that this toxin is adsorbed only at the external surface of clinoptilolite while in the montmorillonite all active sites are equally available for its adsorption. Thus, the concentrate of montmorillonite possesses higher adsorption capacity for aflatoxin B₁. Results presented in this paper confirmed the fact that the differences in the structure of minerals led to their different efficiency for adsorption of aflatoxin B₁. Mineralogical and chemical composition, determination of cation exchange capacity, etc., are very important parameters influencing the effectiveness of minerals as aflatoxin B₁ adsorbents.

Keywords: Mycotoxins • Aflatoxin B₁ • Adsorption • Clinoptilolite • Montmorillonite