



Универзитет у Нишу
Природно-математички факултет
Департман за хемију



Наташа В. Радосављевић-Стевановић

**Нови форензички аспекти примене
резултата анализе система:
земљиште – биометали – биоматеријали**

Докторска дисертација

Ниш, 2014



University of Niš
Faculty of Sciences and Mathematics
Department of Chemistry

Nataša V. Radosavljević-Stevanović

**New forensic aspects of the application of the
results of the analyses of the systems:
soil – biometals – biomaterials**

PhD thesis

Niš, 2014

Информације о ментору и члановима комисије

Подаци о ментору и члановима комисије

1. Проф. Др. Ружица Николић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу – ментор
2. Проф. Др. Славица Ражић, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду – члан комисије
3. Проф. Др. Нико Радуловић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу – члан комисије
4. Проф. Др. Зоран Тодоровић, ванредни професор Технолошког факултета у Лесковцу Универзитета у Нишу – члан комисије

Датум одбране: _____

Ова докторска дисертација је урађена у лабораторијама Департамента за хемију Природно-математичког факултета у Нишу и лабораторији за физичко-хемијска вештачења Националног криминалистичко-техничког центра Министарства унутрашњих послова Републике Србије. Део доктората урађен је у Лабораторији за спектроскопију Технолошког факултета у Лесковцу и Институту за нуклеарне науке „Винча“.

Захваљујем се др Ружици Николић, редовном професору Природно-математичког факултета у Нишу на предложеној теми докторске дисертације, руковођењу, свесрдном залагању, изузетној помоћи и сугестијама при изради исте.

Захваљујем се др Славици Ражић, редовном професору Фармацеутског факултета у Београду на помоћи приликом израде анализа и интерпретацији резултата, као и указаним смерницама приликом израде дисертације.

Захваљујем се др Ненаду Крстићу, доценту Природно-математичког факултета на помоћи пруженој приликом техничког уређења ове дисертације, као и др. Братиславу Тодоровићу, доценту Технолошког факултета у Лесковцу на помоћи у реализацији FTIR испитивања.

Изузетну захвалност дугујем члановима своје породице, супругу и ћерки на толеранцији, разумевању и подршци коју сам имала током израде ове дисертације.

На крају, али не мање важно, захваљујем се својој мајци на труду који је уложила на мом животном путу.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Наташа В. Радосављевић-Стевановић
Ментор, МН:	Ружица С. Николић
Наслов рада, НР:	Нови форензички аспекти примене резултата анализе система: земљиште – биометали – биоматеријали
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2014.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља; 135 страна; 210 цитата; 16 табела; 30 слика
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Бионеорганска хемија, Хемија земљишта, Хемија природних производа
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Биометали, Биоматеријали - хидроксиапатит, <i>Cannabis sativa</i> / хидроксиапатит, <i>Cannabis</i> , земљиште, јони биометали, ICP-OES, AAS, FT/IR, SEM-EDS, PCA.
УДК	343.983 : (631.42 + 546.4 + 577.118 + 66.017) 517.984/.986 (043.3)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:

У овој докторској дисертацији испитиване су интеракције у модел системима **земљиште – биоеlementи (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Pb, Cr, Mn) – биоматеријали** (минерално ткиво зуба човека, крв и биљна врста из рода *Cannabis sativa*), као потенцијално интересантни у форензичким испитивањима. Модел системи и настале интеракције испитивани су применом одговарајућих, расположивих инструменталних метода и техника анализе: ICP-OES, AAS, SEM-EDS, FT-IR, XRD, GC-FID. Добијени резултати показују да долази до промена неорганског биоматеријала - у минералном матриксу и степену кристаличности минералног ткива зуба под дејством природне средине. Миграције биометала у системима зависе од врсте средине и времена изложености. Резултати указују да постоји корелација садржаја појединих метала у различитим деловима биљке и земљишта на којем је узгајана, као и корелација према садржају канабиноида, услед утицаја метала на биосинтезу ових једињења у биљној врсти *Cannabis sativa*.

Добијени резултати омогућавају извођење закључака о ефектима промена у биоматеријалима, као форензичким узорцима, под дејством агенаса из природне средине. Интеракције испитиваних биоматеријала са земљиштем могу бити потенцијално важне у форензичким испитивањима у домену одређивања: временске изложености биоматеријала зуба дејству одређене средине, врсте земљишта која је интераговала са биоматеријалом зуба, географског порекла биоматеријала биљне врсте *Cannabis sativa* L.

Датум прихватања теме, ДП:

01.07.2013. године

Датум одбране, ДО:

Чланови комисије, КО:

Председник:

Члан:

Члан, Ментор:

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
KEY WORDS DOCUMENTATION	

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Nataša V. Radosavljević-Stevanović
Mentor, MN :	Ružica S. Nikolić
Title, TI :	New forensic aspects of the application of the results of the analyses of the systems: soil – biometals – biomaterials
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2014.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters; 135 pages; 210 references; 16 tables; 30 figures
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Bioinorganic chemistry, Chemistry of Soils, Natural products Chemistry
Subject/Key words, SIKW :	Biometals, Biomaterials - hydroxyapatite, <i>Cannabis sativa</i> / hydroxyapatit, <i>Cannabis</i>, soil, biometals ions, ICP-OES, AAS, FT/IR, SEM-EDS, PCA.
UC	343.983 : (631.42 + 546.4 + 577.118 + 66.017) 517.984/.986 (043.3)
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, AB :	The interactions in model systems of soil - bioelements (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Pb, Cr, Mn) - biomaterials (mineral tissue of human teeth, blood and plant species of the genus <i>Cannabis sativa</i>), as potentially interesting in forensic investigations, were examined in this PhD thessis. Model systems and the resulting interactions were tested using the appropriate available instrumental methods and analysis techniques: ICP - OES, AAS, SEM - EDS, FT -IR, XRD, GC - FID. The results showed a change of inorganic biomaterials - the mineral matrix and the degree of crystallinity of mineral teeth structure under the influence of the environment. Biometals migration in the systems depends on the type of environment and exposure time. The results indicate that there is a certain correlation between the content of metals in different parts of the plants and the soil in which it was grown and the correlation to the cannabinoids content, due to the influence of the metals on the biosynthesis of these compounds in the plant species of <i>Cannabis sativa</i>. The obtained results allow developing of conclusions about the effects of changes in biometaterials as forensic samples, under the influence of the agents in the environment. Interaction of the examined biomaterials with the soil may be potentially important in forensic investigations in the field of determining: the exposure time of dental biomaterials to the particular environment effects, types of soil that interacted with dental biomaterials, geographical origin of plant species <i>Cannabis sativa</i> L. as the biomaterials.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	1 st of July 2013.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member, Mentor:

САДРЖАЈ

1. УВОД	13
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	17
2. 1. ЗЕМЉИШТЕ	18
2.1.1. Чврста фаза земљишта	19
2.1.2. Течна фаза земљишта	21
2.2. БИОМЕТАЛИ	27
2.2.1. Магнезијум	28
2.2.2. Калцијум	29
2.2.3. Цинк	30
2.2.4. Гвожђе	31
2.2.5. Бакар	32
2.2.6. Манган	33
2.2.7. Хром	34
2.2.8. Олово	36
2.3. БИОМАТЕРИЈАЛИ	37
2.3.1. Зуби	38
2.3.2. <i>CANNABIS SATIVA L.</i>	42
2.4. МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА ЗЕМЉИШТЕ- БИОМЕТАЛИ- БИОМАТЕРИЈАЛИ	45
2.4.1. Стереo микроскопска карактеризација медијума и биоматеријала дентина ..	45
2.4.2. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR)	45
2.4.3. Рентгенска дифракциона спектрометрија (XRD)	47
2.4.4. Скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом	48
спектроскопија (SEM-EDS)	48
2.4.5. Индуктивно спрегнута плазма - оптичка емисиона спектроскопија	49
(ICP-OES)	49

2.4.6. Атомска апсорпциона спектроскопија (AAS).....	51
2.4.7. Одређивање параметара крви у биоматеријалу крвног ткива.....	52
2.4.8. Одређивање садржаја органских једињења у биоматеријалу биљне врсте <i>Cannabis sativa</i>	52
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	55
3.1. ХЕМИКАЛИЈЕ И МАТЕРИЈАЛ КОРИШЋЕНИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РАД	57
3.2. МОДЕЛ СИСТЕМИ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – МИНЕРАЛНО КОШТАНО ТКИВО ЗУБА.....	58
3.2.1. Припрема медијума и минералног коштаног ткива зуба за	58
моделовање система	58
3.2.2. Карактеризација медијума	59
3.2.3. Одређивање садржаја биометала.....	59
3.2.4. Анализа система биометријал крв - олово	60
3.2.5. Минералозна испитивања биоматеријала.....	60
3.2.6. Статистичка обрада резултата мерења	62
3.3. МОДЕЛ СИСТЕМИ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – БИЉНА ВРСТА CANNABIS SATIVA.....	63
3.3.1. Идентификација биљног материјала	63
3.3.2. Одређивање садржаја биометала	63
3.3.3. Одређивање садржаја канабиноида	64
3.3.4. Упоредивање садржаја канабиноида у различитим биоматеријалима биљне врсте <i>Cannabis sativa</i>	64
3.3.5. Одређивање корелације између садржаја метала и садржаја канабиноида. Статистичка обрада резултата.....	65
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	66
4.1. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА У МОДЕЛ СИСТЕМУ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – МИНЕРАЛНО КОШТАНО ТКИВО ЗУБА	67
4.1.1. Структурна карактеризација медијума.....	67
4.1.2. Структурна карактеризација биоматеријала зуба	70

4.1.3. Праћење интеракције медијуми - биоматеријал зуба	73
4.1.4. Праћење интеракције медијуми – биометали – биоматеријал зуба.....	101
4.2. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА У МОДЕЛ СИСТЕМУ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – БИЉНА ВРСТА <i>Cannabis sativa</i> L.....	107
4.2.1. Идентификација биоматеријала биљне врсте <i>Cannabis sativa</i> L.....	107
4.2.2. Одређивање садржаја биометала у земљишту и биоматеријалу	108
<i>Cannabis sativa</i> L.	108
4.2.3. Одређивање садржаја канабиноида у биоматеријалу <i>Cannabis sativa</i> L.	112
4.2.4. Упоредивање садржаја канабиноида у различитим биоматеријалима биљне врсте <i>Cannabis sativa</i>	113
4.2.5. Праћење интеракције земљиште – биометали – биоматеријал биљне врсте	116
<i>Cannabis sativa</i> L.	116
5. ЗАКЉУЧАК	124
6. CONCLUSION.....	128
7. ЛИТЕРАТУРА.....	132

Скраћенице коришћене у тези

Скраћеница	Значење на енглеском	Значење на српском
FT-IR	Fourier Transform Infra Red Spectroscopy	Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом
XRD	X-Ray Spectrometry	Рентгенска дифракциона спектрометрија
SEM-EDS	Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectroscopy	Скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом спектрометријом
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy	Индуктивно спрегнута плазма - оптичка емисиона спектроскопија
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy	Атомска апсорпциона спектроскопија
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectroscopy	Пламена атомска апсорпциона спектроскопија
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy	Безпламена атомска апсорпциона спектроскопија са графитном електродом
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector	Гасна хроматографија са пламено јонизујућим детектором
TLC	Thin Layer Chromatography	Танкослојна хроматографија
C.E.C.	Cation Exchange Capacity	Катјонски измењиви капацитет
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime	Канцеларија Уједињених нација за дроге и криминал
EMCDDA	European Monitoring Center for Drugs and Drugs Addiction	Европски мониторинг центар за дрогу и зависност
МУП	/	Министарство унутрашњих послова
THC	Tetrahydrocannabinol	Тетрахидроканабинол
CBD	Cannabidiol	Канабидиол
CBN	Cannabnol	Канабинол
CBGA	Canabigerolic Acid	Канабигеролна киселина
THCA	Tetrahydrocannabinolic Acid	Тетрахидроканабинолна киселина
CBDA	Cannabidiolic Acid	Канабидиолна киселина
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	Флавин аденин динуклеотид
PCA	Principal Component Analyses	Анализа главних компонената

1.УВОД

Форензичка испитивања обухватају широк опсег проучавања различитих материјала који се могу наћи на месту извршења кривичног дела са коначним циљем проналажења закључака који воде ка откривању починиоца кривичних дела. Ова врста испитивања је врло комплексна и интердисциплинарна.

Велики број инструменталних метода и техника анализе налази своју примену у форензичким испитивањима. Обрада и интерпретација резултата добијених применом ових метода врши се на различите начине, зависно од врсте метода и материјала који је испитиван. Ипак, мањи број истраживања је посвећен изналажењу корелација између група резултата добијених употребом истих или различитих метода анализе примењених на предметним материјалима.

Предмет ове дисертације су хумани биоматеријали (минерално ткиво зуба човека и крв, као потенцијални форензички материјали) и биљни биоматеријал (биљна врста из рода *Cannabis sativa*) укомпоновани у систем којим је омогућена интеракција ових биоматеријала са спољашњим медијумима (земљиште и вода) уз праћење садржаја и дистрибуције неких биоелемената.

Ефекти дејства природних медијума на антропогени материјал су до сада испитивани, али су, према литературним подацима, истраживања била усмерена углавном на испитивање састава минералног ткива костију, као биоматеријала који је био одложен у земљишту. Нема литературних података о досадашњим детаљним истраживањима о томе како се минерално ткиво зуба и биометали, конституенти истог, понашају у системима у којима постоји могућност за интеракцију са спољашњим медијумима у природној средини. Различите врсте земљишта и вода, као спољашњи медијуми са својим саставом и физичко-хемијским особинама, могу бити потенцијални извор агенаса и могу представљати повољну средину за интеракције са одложеним антропогеним биоматеријалом. Минерално ткиво зуба је подложно квантитативним променама уз очување макро структуре под дејством агенаса спољашње средине.

Наша претходна испитивања су показала да се садржај неорганских компоненти биоматеријала мења, током стајања у природној средини, земљишту. Промене које су настале интеракцијом између хуманог биоматеријала и спољашњих медијума су: миграција јона биоелемената, промена њиховог садржаја, као и структурне, морфолошке и промене у минералном матриксу хуманог биоматеријала.

Биљни биоматеријал, биљна врста *Cannabis sativa*, као чест форензички узорак, такође је предмет испитивања у овом раду. Ова биљна врста се најчешће гаји у затвореном, на одређеној подлози, и у контролисаним условима или на отвореном.

Природа и састав подлоге утичу на усвајање, мобилност и дистрибуцију биоелемента у различитим деловима биљке. Интеракција између земљишта, на коме је материјал био одгајан и биљке испитивана је по сегментима биљке у смислу праћења садржаја одређених метала и органских једињења-канабиноида, карактеристичних само за биљну врсту *Cannabis sativa*. Од нарочитог је значаја постављена корелација садржаја метала у систему: биљка - земљиште у којем је биљна врста узгајана, као и корелација садржаја метала и канабиноида у листовима испитиваних биљака, што пружа могућност потенцијалног одређивања места илегалне производње ове, законом санкционисане, биљне материје.

У овој тези експерименталним испитивањима проучавани су ефекти утицаја времена, у природним медијумима (воде и земљиште), на хумани биоматеријал у циљу проналажења одређене униформности и корелације у погледу миграције појединих М (II) биометала у систему **минерално ткиво зуба – земљиште**.

О томе како земљиште утиче на садржај канабиноида у биљној врсти *Cannabis sativa*, већ постоје нека истраживања, али су недовољна за потребе одређивања порекла оваквог биоматеријала. Квантитативном анализом биоматеријала, уз примену хеометријских метода анализе, анализиран је ниво корелације између садржаја метала у земљишту и различитим деловима биљке, као и корелација садржаја метала у односу на садржај канабиноида, а све у циљу утврђивања непознатог порекла биоматеријала.

Генерално, добијени резултати омогућавају извођење закључака о ефектима промена у биоматеријалима, као форензичким узорцима, под дејством агенаса из природне средине. У једном делу испитивања, то су промене у минералном матриксу и степену кристаличности минералног ткива зуба, а другом, корелација садржаја појединих метала у различитим деловима биљке и земљишта на којем је узгајана, као и корелација према садржају канабиноида.

Интеракције у модел системима **земљиште – биоелементи – биоматеријали** су праћене и проучаване одговарајућим инструменталним методама и техникама анализе.

Анализа садржаја метала у чврстом минералном ткиву зуба и природним медијумима (земљиште и вода), у којима је ткиво било одложено, као и утврђивање садржаја метала у биљној врсти *Cannabis sativa* и земљишту, у коме су узгајане, изведена је применом емисионих и апсорпционих техника атомске спектроскопије, као што су Индуктивно спрегнута плазма са оптичком емисионом спектроскопијом

(ICP-OES) и пламена и беспламена техника атомске апсорпционе спектроскопије (FAAS и GFAAS).

За праћење промена у морфологији површине минералног ткива зуба као биоматеријала, као и идентификовање промена у елементарном саставу овог биоматеријала насталих након интеракције ткива са спољашњим медијумима примењена је Скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом спектроскопијом (SEM-EDS).

За утврђивање промена минеролошког састава минералног ткива зуба као биоматеријала, насталих након интеракције ткива са спољашњим медијумима примењена је Рентгенска дифракција (XRD), а за утврђивање структурних промена минералног ткива зуба као биоматеријала насталих након њихове интеракције са спољашњим медијумима Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR).

Гасна хроматографија са пламено јонизујућим детектором (GC-FID) примењена је за квантитативну анализу канабиноида у узорцима биљне врсте *Cannabis sativa*.

У статистичкој обради резултата примењен је Student-ов t-тест, а у хеометријској евалуацији резултата мултиваријантне методе анализе, као што су анализа главних компоненти, фактроска, као и кластерска анализа.

Комплетном анализом система **биоматеријали – биоелементи – спољашњи медијуми** успостављена је генерална законитост која важи за миграцију метала у оваквим системима. Добијена законитост потенцијално може да се искористи за одређивање врсте спољашњег медијума са којим су биоматеријали, као форензички узорци, били у интеракцији.

Циљ рада је испитивање могућности примене резултата о врсти и интензитету промена ради доношења закључака о потенцијалној детекцији врсте медијума који је интераговао са биоматеријалом. У ширем смислу, циљ овог рада је испитивање нових аспеката примене резултата анализе земљишта у форензичким студијама.

2.ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2. 1. ЗЕМЉИШТЕ

Земљиште је природна творевина која се састоји од минералних и органских компоненти, а према саставу има одређене физичке, хемијске и биолошке карактеристике. У објашњавању његовог састава користи се апроксимација да се састоји од три фазе: чврсте (минерална и органска), течне и гасовите. Земљиште показује особине које проистичу из физичких и хемијских равнотежа поменутих фаза. У току настајања земљишта уочавају се две етапе. Прва је измена примарних минералних конституената стена физичким и хемијским процесима под дејством временских услова, док је друга, позната као педогенеза, карактеристична по формирању профила земљишта и настајању зрелог зоналног земљишта, што и представља завршни процес интеракције. Утицај временских услова и педогенеза као процеси се не могу лако разликовати или одвојити јер могу да се дешавају симултано и на истом месту (Jakovljević & Pantović, 1991).

Утицај временских услова може хемијски бити описан као процес растварања, хидратације, хидролизе, оксидације, редукције и карбонификације. Сви ови физичко-хемијски процеси су довели до формирања минерала и хемијских компонената које су релативно стабилне и у равнотежи са околним саставом у конкретном земљишту (Pédro, 1979). У биохемијском смислу, временски услови доводе до разлагања почетног материјала и миграције појединих елемената из минерала у растворе и суспензије. Живи организми и производи њиховог разлагања играју значајну улогу у категорији утицаја временских услова. Две врсте једињења насталих ослобађањем из органске материје или из живих организама су нарочито значајне, а то су угљена киселина настала из CO_2 , који потиче из органске материје, и органски хелирајући лиганди, са којим реагују катјони ослобођени из стена и минерала. Сви ови процеси одржавају систем у стању динамичке равнотеже (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

Педогенеза подразумева неколико процеса: обогаћивање земљишта органским и минералним материјалом, губитак ових материјала из земљишта, транслокација ових материјала кроз земљиште-хоризонтално и вертикално, трансформација органских и минералних материја у земљишту. Ови процеси могу бити конструктивни и деструктивни у фази формирања земљишта (Jakovljević & Pantović, 1991).

2.1.1. Чврста фаза земљишта

Минерални део земљишта настаје распадањем литосфере (магматских, метаморфних и седиментних стена) под дејством физичких, хемијских и биолошких фактора (педогенеза) и чини 45% укупне запремине земљишта. Као резултат наведених промена на површини земље настаје педосфера, чија је просечна дебљина око 2 m. Хемијски састав земљишта разликује се од састава литосфере, па су у њему најзаступљенији кисеоник и водоник, садржаји угљеника, силицијума и азота су значајни, док је садржај метала алуминијума, гвожђа, калцијума, калијума, натријума и магнезијума мањи него у литосфери. Примарни минерали (они који садрже кисеонична једињења силицијума: кварц, фелдспати, лискуни, пироксени, амфиболи) су по свом пореклу везани за магматске и метаморфне стене и као такви се у уситњеном стању налазе у земљишту, хемијски неизмењени, али су непостојани и подложни су разлагању. Карбонати (калцит и доломит) и оксиди метала могу бити помоћни минерали у земљиштима влажних климатских зона. Примарни минерали који се налазе у земљишту су већих димензија и нису укључени у процес сорпције, али су свакако извор микронутриената (Kabata-Pendias, 2000). Секундарни минерали настају под дејством најпре физичких промена (температура, ветар, преносна снага воде), а онда и хемијских (утицај воде, присуство кисеоника и киселина: угљене, азотне, сумпорне, лимунске, оксалне, хумусне) и биолошких (утицај разних организама) чинилаца на примарне минерале. Основне хемијске реакције које узрокују хемијско распадање минерала су: хидратација, хидролиза, раставарање и оксидо-редукција. У овим процесима настају секундарни минерали који могу бити просте структуре (хидратисани оксиди гвожђа, алуминијума, силицијума, моно- и двокиселе базе, различите киселине, али и соли настале неутрализацијом киселина и база) и сложене структуре (секундарни алумо- и фери- силикати, тј. минерали глине). Ови минерали чине највећи део минералне чврсте фазе земљишта (Jakovljević & Pantović, 1991).

Саставни део чврсте фазе земљишта јесте органска материја и представља карактеристични део земљишта по коме се оно разликује од матичног супстрата. Првобитна акумулација органске материје настаје као резултат активности нижих организама који насељавају површину стена. Постепено се стварају услови за развој виших биљака, чиме се убрзава акумулација органске материје (Weber, 1988).

Земљиште представља полидисперзни систем јер се његова чврста фаза састоји од честица различите величине (честице песка и колоиди). У најгрубљој фракцији

налазе се честице кварца, док се у ситнијим фракцијама поред кварца налазе и други примарни минерали, као и хранљиви састојци за биљке. Фракција праха садржи и секундарне минерале, док се фракција глине, као најситнија, углавном састоји од секундарних минерала. Како се мења минеролошки састав земљишта, мења се и хемијски састав фракција. Хумус земљишта је сконцентрисан у најфинијој фракцији земљишта. Фракција глине као фино дисперзна одликује се ситним честицама (пречник мањи од 0,2 μm), великим бројем честица и великом површином честица. Високо дисперзне честице активно реагују са земљишним раствором, обзиром на велику додирну површину и као такве представљају најактивнији део земљишта (Kabata-Pendias & Pendias, 2005).

Колоидна фракција земљишта такође се састоји од органског и минералног дела (састоји се од секундарних минерала и аморфних материја-хидроксида гвожђа, алуминијума и силицујума). Педогенетски процеси и плодност земљишта зависе од земљишних колоида, јер су они директно одговорни за адсорптивна својства земљишта. На граничној површини могу да се адсорбују гасови, течности, а такође и материје растворене у течностима (електролити и неелектролити). Најраспрострањенија је позитивна адсорпција при којој долази до повећања концентрације материје у површинском слоју, али се среће и негативна адсорпција приликом које долази до смањења концентрације материје. У глиненим земљиштима адсорпција је изражена јаче него у суглинастим и песковитим земљиштима (Jakovljević & Pantović, 1991). Адсорпција катјона као физичко-хемијски облик адсорпције представља повратну реакцију у којој катјони из спољашњег раствора адсорбујући се у земљишту, истискују еквивалентну количину катјона који прелазе у раствор, при чему се успоставља равнотежа. Способност земљишта да задржава извесну количину катјона у размењивом облику је капацитет адсорпције.

Једно од најзначајнијих својстава земљишта је концентрација водоничних јона, односно рН вредност земљишног раствора (Chuang *et al.*, 1996). Зависно од карактера својих колоида, различити типови земљишта имају различиту киселост и различитог су пуферског капацитета. Поред ових рН вредности у земљишту се могу мерити и осмотски притисак, као и оксидо-редукциони потенцијал (Jakovljević & Pantović, 1991).

2.1.2. Течна фаза земљишта

Такозвани „земљишни раствор“ или течна фаза земљишта је најмобилнији и најреактивнији део земљишта, у њему се дешавају процеси разлагања и синтезе органских материја, образовање органометалних једињења, секундарних минерала и др. Она садржи растворена различита једињења укључујући и бионеорганске комплексе. Концентрација елемената у траговима у земљишном раствору је у корелацији са њиховом мобилношћу и доступношћу (Keller, 1997). Течна фаза је непосредни извор хранљивих елемената и воде, која може бити везана и слободна. Везана вода опстаје у земљишту помоћу адсорпционих сила од стране чврстих честица и може бити хигроскопна (адсорбована на површини честица у облику водене паре) и опнена. Најмању количину хигроскопне воде садрже песковита земљишта, а највећу глиновита. Присуство једновалентних катјона у спољашњем слоју колоида повећава хигроскопност земљишта услед тога што се граде јаче дисосована и више хидратисана једињења. Састав и концентрација земљишног раствора су резултат биолошких, физичко-хемијских, хемијских и физичких процеса. Између чврсте и течне фазе постоји динамичка адсорпциона равнотежа. У земљишном раствору се налази минерална материја у облику анјона и катјона, органска материја (шећери, органске киселине, алкохоли, аминокиселине, ферменти, витамини, антибиотици, токсини...). Хигроскопна вода у земљишту се не креће, не замрзава се на нижим температурама и не проводи струју. Уколико се земљиште које је засићено воденом паром стави у контакт са водом, извесна количина воде ће се адсорбовати и увећати омотач око земљишних честица. Оваква вода је опнена вода. Вода која се у земљишту налази у невезаном стању је слободна и дели се на капиларну и гравитациону (Jakovljević & Pantović, 1991).

2.1.3. Гасовита фаза земљишта

Гасовиту фазу земљишта чини земљишни ваздух, при чему вода и ваздух замењују једно друго у земљишту, па се у периоду веће влажности стварају анаеробни услови. Земљишни ваздух има сличан састав као и атмосферски ваздух. Садржаји кисеоника и угљен диоксида су подложни променама услед биолошких процеса у земљишту, док се земљишном дифузијом омогућава успостављање првобитног састава гасова („дисање“ земљишта). Садржај гасовитог CO_2 је у зависности и од промене влажности земљишта, јер растворени угљен диоксид формира угљену киселину која

утиче на растварање тешко растворних једињења (карбонати прелазе у бикарбонате). У влажном земљишту се земљишни ваздух раставара у извесној мери у земљишном раствору и негативно адсорбује на чврстим честицама (Jakovljević & Pantović, 1991).

2.1.4. Конституенти земљишта

Земљиште садржи елементе у траговима различитог порекла (литогеног, педогеног и антропогеног). Као следећи конституент земљишта, у литератури се помињу минерали који такође могу да подлегну различитим изменама под дејством временских услова и педогенезе. Најзаступљенији су силикати, карбонати, оксиди, хидратисани оксиди, минерали глина... Важну улогу у креирању особина земљишта има органска материја. Присуство микроорганизама је од есенцијалног значаја за ток енергије у земљишту као и за кружење хемијских елемената (Kabata-Pendias, 2000).

Елементи у траговима

Иако елементи у траговима потичу из стена земљишта, њихова дистрибуција и њихово учешће у земљишту даје слику о педогенетским процесима и утицају спољашњих фактора. Сорпција и десорпција елемената у траговима зависи од: рН и Е_h вредности, фине гранулометријске фракције (<0,02mm), органске материје, оксида и хидроксида (углавном Fe, Mn и Al) и микророрганизама. Утврђен је истовремени пораст средње вредности садржаја метала у земљишту и пораст садржаја глинене фракције (Kabata-Pendias & Krakowiak, 1998), као и позитивна корелација метала у траговима (Co, Cu, Ni, Pb и Zn) са садржајем глине у земљишту, услед адсорпције истих на глинене фракције земљишта (Lee *et al.*, 1997). У земљишном раствору ови метали комплексирају углавном са органским молекулима и водом. Ове реакције су рН зависне и у корелацији су са величином и наелектрисањем јона. Већи јонски потенцијал је индикатор за већи степен хидратације и тиме лакшу преципитацију (Kabata-Pendias, 2000).

Минерали глине и алумосиликати

Минерали глине су хидратисани силикати алуминијума, магнезијума и гвожђа (Dobrzanski *et al.*, 1993). Фелдспати су релативно мало отпорни на временске услове, па промене на њима обично омогућавају формирање материјала од којих ће настати глинена минерална фракција. Постоје две главне врсте минерала глине пронађене у земљишту и могу се поделити у пет група: каолинит, монтморилонит (сметит), илит, хлорит, вермикулит, а разликују према начину везивања основне структурне јединице

SiO_4^{2-} . Монтморилонит и илит имају јединичну ћелију изграђену од два силикатна тетраедарска слоја (Si_2O_5) окружујући алуминијумски октаедарски слој, $\text{Al}_2\text{O}_4(\text{OH})_2$. Слабе van der Waals-ове силе постоје између две јединице, тако да вода, нутриенти, хемикалије могу брзо да продру у простор унутрашњих слојева и да реагују са унутрашњом површином, што утиче на могућност монтморилонита и илита да се повећају и продуже у контакту са водом. Каолинит је други тип минерала глина и састављен је од силицијумских тетрадарских слојева везаних за алуминијумски октаедарски слој. Јединичне ћелије у овом типу минерала глинe везане су водоничним везом правећи међуслојни простор. Вода и друге хемикалије улазе у ове просторе, али растојања између слојева остају константна (Jakovljević & Pantović, 1991). Из ових разлога је измењив катјонски капацитет (C.E.C.) знатно већи код глина првог типа него код минерала глинe другог типа (Dube *et al.*, 1993). Глиновита земљишта имају висок капацитет адсорпције катјона, нарочито елемената у траговима; глинe монтморионит и вермикулит имају већи капацитет адсорпције од каолинита. Наиме, честице глинe су обично негативно наелектрисане вероватно услед хидроксилних група које постоје на ивицама спољашњих слојева. Процес уклањања протона са ових група је рН зависан, те при вишим вредностима може бити лако замењен јонима: Ca^{2+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} . Негативна наелектрисања могу бити узрокована и изоморфном јонском заменом: Al^{3+} може заменити Si^{4+} , док Mg^{2+} и Fe^{2+} могу заменити Al^{3+} . Могућност креирања негативних наелектрисања највећа је код првог типа минерала глина (Dobryanski *et al.*, 1993; Brown, 1998). Органски колоиди имају већу способност адсорпције катјона од минералних колоида (Kabata-Pendias, 2000).

Оксиди и хидроксида

Неколико врста оксида (силицијум оксид, титанов оксид, алуминијум оксид) и хидроксида се често налази у земљишту. Међу њима су оксиди Fe и Mn који земљишту дају одређени степен пигментације. Ови оксиди су изложени редукционим, оксидационо-преципитационим реакцијама, као и хелатним повезивањима, па имају високи сорпциони капацитет, нарочито за елементе у траговима (Cu, Ni, Co,...). Количина појединачних јона која је адсорбована зависи углавном од рН равнотежног раствора. Максималне вредности адсорбованих јона на оксидима гвожђа присутне су за рН од 4 до 5 (Schwertman & Taylor, 1977). Адсорпција појединих метала значајно је омогућена присуством хуминских супстанци (Laxen, 1985). Хидратисани оксиди Fe и Mn су једињења најзначајнија за сорпцију метала у траговима и показују различите

афинитете према катјонима који имају приближно исте дијаметре у односу на Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} и Fe^{3+} , као што су Co^{2+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{4+} и Ag^{+} .

Карбонати

Карбонати су уобичајени конституент у земљиштима у областима где је количина падавина смањена. У земљиштима у којима има много влаге карбонати се раставарају. Калцијумов јон је доминантни катјон у растворима скоро свих земљишта. Калцит је најраспрострањенија и релативно мобилна форма калцијум карбоната присутна у земљишту која има главни утицај на рН и сходно томе и на понашање елемената у траговима (Kabata-Pendias, 2000).

Елементи у траговима могу да копреципитују са карбонатима, да се инкорпорирају у структуру карбоната или могу бити сорбовани на оксидима (претежно Fe и Mn) који су сталожени на површини карбоната или на честицама земљишта. Метални јони такође могу да утичу на таложење карбоната (Jenne, 1977). Велики афинитет за реакцију са карбонатима показују Co, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Sr и U, па тако једињења као: $CdCO_3$, $Cu(OH)_2CO_3$ и $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$ постоје у неутралним и или алкалним земљиштима. Велики број елемената под различити геохемијским условима може заменити калцијум у нодуларном калциту.

Фосфати

Кристалне форме фосфата се ретко појављују у земљишту. Постоји мало података о постојању калцијум фосфата (апатита и хидроксиапатита) или других фосфата у земљишту (Kabata-Pendias, 2000). Литераурни подаци показују да смеша Ca, Fe и Al фосфата егзистира у земљишту (Jenne, 1977). Елементи као: Ba, Bi, Cu, Li, Mn, Pb, Re, Sr, Th, U и Zn могу бити инкорпорирани заједно са Fe^{3+} и Al^{3+} у хидратисане фосфате.

Сулфиди, сулфати и хлориди

Сулфиди, сулфати и хлориди су занемарљиви у влажним земљиштима, док су у безводним земљиштима доминантни у контроли понашања елемената у траговима. Метални јони као Fe^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} и Cu^{2+} могу да формирају релативно стабилне сулфиде у поплавленим земљиштима, док поједини тешки метали (Cd, Co, Ni, Sn, Ti и Zn) могу копреципитовати са сулфидима гвожђа (Jenne, 1977; Vochten & Geyes, 1972). Сулфиди тешких метала нису чести у земљишту, док се сулфати гвожђа, алуминијума и калцијума најчешће срећу у оксидујућим земљишним условима. Хлориди као најрастворљивији се срећу једино у земљиштима безводних и сушних климатских подручја.

Органска материја

Органска материја земљишта састоји се од смеше биљних и животињских продуката у различитим фазама разлагања и супстанци које су хемијски и биолошки синтетисане. Поједностављено, овај комплексни материјал може бити подељен на хуминске и нехуминске супстанце. Органска материја се налази у разним депозитима и природним водама. Садржај органског угљеника у земљишту може превазилазити количину угљеника у живим организмима.

Органске супстанце играју значајну улогу у бихемијским и геохемијским изменама елемената у траговима.

Највећи део органске материје у земљиштима потиче од биотичких остатака из биолошких декада. Коначни производи ових деградација су хуминске супстанце, органске киселине, угљени хидрати, протеини, пептиди, аминокиселине, липиди, воскови, полициклични ароматични угљоводоници и фрагменти лигнина. У земљишту су такође присутни и екскрециони производи из корена биљака.

Најстабилнија једињења у земљишту су хуминске супстанце чије су фракције: хуминска киселина, фулвинска киселина и хумин (производи старења хуминских и фулвинских киселина; имају висок степен полимеризације и ниску киселост). Све ове компоненте су сличне по структури, али се разликују по реакцијама. Хуминске супстанце су једињења дугачких ланаца, садрже релативно висок број функционалних група (CO_2 , $-\text{OH}$, $=\text{C}=\text{C}=$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$,...) и имају висок афинитет за интеракцију са металним јонима, те могу формати стабилне (хелатне) комплексе са одређеним катјонима. Хуминске супстанце врло лако могу бити адсорбоване од стране глине и честица оксида (Kabata-Pendias, 2000).

Интеракције између метала и хуминских киселина су описане као измена јона, површинска сорпција, хелатизација, коагулација, пептизација. Треба напоменути да метал може бити везан за два или више лиганда из различитих молекула. Све реакције између органске материје и катјона резултују формирању комплекса који су растворни и/или нерастворни у води. Органска материја и неки производи разлагања могу служити као редукциона средства и тиме помагати покретљивост појединих елемената. Ова средства формирају комплексне јоне са различитим катјонима. Студије су показале да је растворљивост комплекса хуминских киселина са Fe, Cu, Ni, Cd и Mn супротна у односу на предвиђену растворљивост комплекса ових метала са неорганских компонената (Scholkovitz & Copland, 1981).

Органска материја је важна за транспорт и акумулацију металних јона присутних у земљишту и водама и има улогу хелатних агенаса, формирањем комплексних једињења метални јони постају доступни за корен биљака. Тешки метали у земљишту имају тежњу да се акумулирају у органским супстанцама, па тако уколико је мањи садржај метала, већа је енергија везивања метало-органских група (Cunino *et al.*, 1979). Обзиром на то да су комплекси тешких метала са хуминским киселинама нерастворни, могу се сматрати складиштем органских супстанци у земљишту. Високи садржај органске материје земљишта утиче на понашање елемената у траговима. Рецимо дефицит ових елемената је виђен код биљака израслих на сувом земљишту пуном тресета, што је узроковано задржавањем Cu, Zn, Mo и Mn нерастворним хуминским киселинама. Јака фиксација бакра у земљиштима богатим хумусом може резултовати високим односом Mo према Cu у биљкама. Додавање органске материје земљишту изазива пораст броја микроорганизама који могу даље смањити садржај неколико катјона и тиме повећати њихову доступност биљкама.

Једноставна органска једињења која постоје у земљишту, као што су: аминокиселине, хидрокси киселине и фосфорна киселина су ефикасни хелатни агенси за елементе у траговима. Растворљивост овако насталих комплекса зависи од јачине веза у комплексу и покретљивости, а одређена је величином органског молекула. Јако везивање метала за органске супстанце малих молекулских маса ће повећати његову покретљивост у земљишту. Могућност једноставних органских киселина (аминокиселине) да растворе тешке метале је од значаја за кружење метала.

Органска материја може бити везана за силикатну површину у минералима глина на преко Al^{3+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} мостова, Van der Waals-овим силама, водоничним везама, адсорпцијом и асоцијацијом са хидратисаним оксидима (Kabata-Pendias, 2000).

Живи свет у земљишту

Живи свет у виду флоре и фауне обилато је заступљен у земљишту. Заступљеност микроорганизама у површинском делу земљишта варира зависно од врсте земљишта и климатских услова. Микроорганизми су важни у еколошком смислу јер производе, конзумирају и транспортују материје у земљишту (Brooks *et al.*, 2005). Најзначајнија улога микроорганизама јесте обављање деградационих процеса биљних и животињских остатака у земљишту. Тешки метали су токсични за многе микроорганизме, редукују њихов раст и ензимску активност. Ипак, неки микроорганизми су успели да изграде механизам за детоксификацију (Kabata-Pendias, 2000).

2.2. БИОМЕТАЛИ

Биометали су заступљени у биљном и животињском свету и човеку, где су укључени у биолошке и биохемијске процесе. Могу бити s- (Na, K, Ca, Mg) и d- (Fe, Zn, Cu, Mn, Cr, Co, Mo) елементи. Они улазе у живи свет животиња и људи кроз ланац исхране, док се у биљни свет уносе преузимањем из земљишта. Биометали који се у траговима налазе у земљишту углавном су у облику комплекса различите растворљивости, могу се сорбовати и десорбовати, уградити се или излуживати из земљишта.

Метали у биолошким системима имају разноврсну улогу и неопходни су за нормално одвијање важних физиолошких процеса. Различити хемијски елементи могу бити присутни у ћелијским органелама у различитим облицима, у облику неорганских једињења или трансформисани у координациона једињења после ћелијског метаболизма (Ortega *et al.*, 2009). Натријум и калијум су структурни елементи и учествују у одржавању наелектрисања и осмотског притиска. Јони прелазних метала су структурни елементи у појединим ензимима или су покретачи активности протеина. Прелазни метали који постоје у облику више оксидационих стања, учествују у оксидоредукционим процесима и транспорту кисеоника, или су саставни део ензимских система. Јони метала могу, зависно од оксидационог стања и локације у биолошком систему, имати различите функције (Roat-Malone, 2007). Иако спадају у есенцијалне елементе за функционисање биолошких система, прекомерне количине ових метала могу изазвати хроничну интоксикацију биосистема с обзиром на могућност акумулирања у различитим ткивима и органима, што је посебно карактеристично за Cu, Cr, Zn, Mo, као и Pb и Cd који нису биометали, али могу исте замењивати у одређеним биомолекулима што може да изазове значајан поремећај биохемијских функција у организму.

У биљкама као биосистемима, Zn, Mn и Fe су важни коензими, Cu се лако везује за аминокиселине, а Mn за биомакромолекуле формирајући координативна једињења (Ražić *et al.*, 2005). Концентрација биометала у биљкама је у директној корелацији са њиховом засушљеношћу у земљишту. Одговарајући баланс између метала у траговима и макрометала има значајну улогу у биохемијским процесима биљака (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

2.2.1. Магнезијум

Магнезијум се у земљиној кори налази у количини од 2,1%; заступљен је у облику карбоната и разноврсних силикатних минерала (Filipović & Lipanović, 1985). Магнезијум је високо доминантни метал у алкалном земљишту и утиче на његову киселост. Примарни минерал магнезијума који коригује киселост земљишта је доломит. (Mikkelsen, 2006).

Јон Mg^{2+} је малих димензија (0,06 nm), док је радијус хидратисаног јона много већи у односу на неке друге јоне, те много спорије измеђује молекуле воде из хидратисане сфере. Остали фактори који одрђују биолошку улогу Mg^{2+} јона су координациони број и координациона геометрија, ниво измене растварача и његов транспортни број (дефинисан као просечан број молекула растварача асосован са катјоном довољно јако да може да мигрира са катјоном у раствор). Mg^{2+} хидратише са шест молекула воде. Управо због малог јонског радијуса и велике електронске густине, Mg^{2+} јон има тенденцију да у своју унутрашњу координациону сферу везује мале лиганде молекула воде пре него волуминозније лиганде. Велика густина наелектрисања чини овај јон добром Луисовом киселином; нпр. Mg^{2+} активира нуклеофил, при чему нуклеофил бива конвертован у анјонску форму (нпр. вода се конвертује у хидроксилни анјон (Kabata-Pendias, 2000)).

Магнезијум у живом свету

Магнезијум је есенцијални елемент за људе и неопходан је као кофактор за активацију више од 300 ензимских система, углавном за активацију фосфатних група у једињењима богатим енергијом (Shiels *et al.*, 2005). У биолошким системима, Mg^{2+} јон постоји у три различита стања: везан за протеине, комплексиран са анјонима и слободан. Само слободан магнезијум има биолошку активност. Тело одрасле особе саджи приближно 24 g/mol магнезијума у ћелијама у преко 280 mg/mol екстрацелуларној течности. Скелет човека садржи око 60% укупне количине магнезијума (Halpern, 1985). Магнезијум се у организам уноси кроз ланац исхране и преко воде за пиће.

Најважнија улога магнезијума у биљкама је то што је конституент хлорофила. Обзиром на богати садржај овог метала у земљишту, по вероватноћи дефицита, магнезијум спада у секундарне нутриенте. Ретка је појава његовог дефицита у биљкама, мада је забележена у случајевима узгајања биљака на киселим и песковитим

земљиштима. Дефицит овог метала се прво препознаје према лишћу које почиње да бледи. (Mikkelsen, 2006).

2.2.2. Калцијум

Према заступљености у земљиној кори, калцијум је пети елемент по реду, са око 3,5%. Калцијум је метал заступљен у земљи претежно у облику карбонатних и силикатних минерала уз мале количине сулафта и фосфата (Filipović & Lipanović, 1985). Калцијум је заступљен у земљишту нарочито у алкалном, као високо доминантан. Као такав утиче на рН земљишта, а примарни његов минерал који коригује киселост у земљишту је калцит (Mikkelsen, 2006).

Без обзира што Са и Мг припадају истој групи елемената, разлика у структури, термодинамичкој стабилности и степену реактивности Ca^{2+} јона у односу на Mg^{2+} јон узрокована је већим јонским радијусом Ca^{2+} јона (0,094 nm). Већи Ca^{2+} јон има могућност формирања асоцијата флексибилне геометрије (координациони број 7-10) (Crichton, 2008), што као последицу има деформацију валенционих углова од 90° на 40° и везивање више различитих центара одједном. У воденој средини овај јон преко О-атома, као донора, реагује са анјонима, неутралним молекулима или фрагментима биомолекула. (Kabata-Pendic, 2000).

Калцијум у живом свету

Калцијум је у живим организмима заступљен у макро количинама, више од било ког есенцијалног биометала. Биоминерал хидроксиапатит који се налази у зубима и костима садрже већину количине калцијума из организма (~99%). Око 1% присутног калцијума налази се у крвној плазми и осталим меким ткивима. На нивоу ћелије, калцијум се сматра одговорним за ћелијску комуникацију (Guyton & Hall, 1999). Калцијум учествује у великом броју ћелијских активности: контракција мишића, коагулација крви, ослобађање и синтеза хормона. Калцијум као коензим учествује у неким метаболичким реакцијама (Kovačević *et al.*, 1996).

Улога калцијума је у ојачавању ћелијских зидова биљака. Овај метал је мало заступљен у ћелијама али је у раствору присутан у виду јона, док се вишак налази у вакуолама. Његова есенцијална улога је у активацији појединих ензима. Дефицит калцијума у биљкама је ретка појава, а огледа се у слабљењу мембрана и смањеној отпорности биљака. (Mikkelsen, 2006).

2.2.3. Цинк

Цинк је заступљен у земљиној кори у количини од $(5,2-8,0) \cdot 10^{-3}\%$. (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007) обично у облику сулфида, оксида и карбоната. Цинк је углавном равномерно дистрибуиран у стенама. Може бити супституент магнезијума. У киселој и оксидујућој средини дешава се растварање минерала цинка и формирање његове покретљиве форме у виду слободног јона или у форми комплекса. Глине и земљишна органска материја везују цинк прилично чврсто. У песковитим и киселим земљиштима, органска материја је одговорна за везивање цинка (Kabata-Pendias, 2000). Zygin *et al.* (1976) су утврдили да је цинк у земљишту везан углавном за хидратисане оксиде гвожђа и алуминијума и глине. Доступност и растворљивост цинка негативно је корелисана са засићењем калцијумом.

Zn^{2+} јон је у редокс смислу инактиван услед његове d^{10} конфигурације последњег енергетског нивоа. Величина и наелектрисање лиганда утичу на координациони број и геометрију комплекса Zn^{2+} , па овај метал формира асоцијате различитог нивоа уређености и геометријске структуре, при чему доминира тетраедарска геометрија, благо деформисана са посебним афинитетом према О-донор лигандима (Crichton, 2008).

Цинк у живом свету

После гвожђа, цинк је други најзаступљенији d-метал у траговима у људском организму (Kabata-Pendias, 2000). Цинк је конституент многих ензима (дехидрогеназе, пептидазе, протеиназе и др.) где омогућава везивање супстрата за активни центар ензима и утиче на стабилност ензима и комплекса ензим - супстрат. Такође, има улогу у метаболизму угљених хидрата, протеина и фосфата, РНК и формирању рибозома.

Према резултатима бројних истраживања цинк се акумулира у зрелом лишћу, коренов систем садржи цинка више него вршни делови биљке. У присуству довољне концентрације цинка, јон Zn^{2+} може бити транслоциран из корена и акумулиран у вршним деловима биљке. Растворне форме цинка су лако доступне биљкама и преузимање цинка од стране биљака линеарно је зависно од концентрације овог метала у земљишту. Степен апсорпције је различит код различитих врста биљака, па неке биљке могу послужити као индикатори цинка у земљишту (Kabata-Pendias, 2000).

2.2.4. Гвожђе

Гвожђе је после алуминијума други метал по заступљености у литосфери (чини 5%). Концентрисано је углавном свим типовима стена у облику оксида, карбоната или сулфида (Filipović & Lipanović, 1985). Гвожђе се у земљишту јавља у форми оксида, хидратисаних оксида или асосовано са површинским минералима. Понашање гвожђа у земљишту је тесно повезано са кружењем кисеоника, сумпора и угљеника, а присуство овог метала у одрђеном хемијском облику у земљишту углавном зависи од Eh-pH система, као и од његовог оксидационог стања. Оксидациони и алкални услови фаворизују преципитацију гвожђа, док кисели и редукциони услови фаворизују растварање једињења гвожђа. Слободни јони гвожђа лако могу преципитовати или могу заменити јоне Mg и Al у структури различитих силикатних, посебно глиненених минерала. Гвожђе у земљишту показује велики афинитет да формира мобилне органске комплексе и хелате (у земљишту богатом органском материјом) обзиром на изразиту тенденцију да у оксидациој средини као Fe^{3+} гради комплекске преко O- дозор атома из биомолекула или биљног материјала (Kabata-Pendias, 2000). Слободни минерали гвожђа у земљишту могу послужити за карактеризацију земљишта и његових зона Lindsay (1979).

Према валентној електронској конфигурацији Fe: $[\text{Ar}] 4s^2 3d^6$, гвожђе има могућност да формира оксидациона стања +2 и +3. Јон Fe^{3+} постоји у оксидационој средини, нерастворан је у води и понаша се као „тврда“ киселина па се углавном везује за „тврде“ кисеоничне лиганде. Јон Fe^{2+} постоји у редукционој средини, растворан је у води, на граници између „тврди“ и „меких“ киселина и има афинитет везивања за азот и сумпор у различитим лигандима, те је као такав и доступнији у природи. Могућност гвожђа да учествује у каталитичким и оксидо-редукционим реакцијама потиче од варијабилности $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ редокс потенцијала, као и могућности да се исти повећа или снизи у присуству одговарајућих лиганата, чиме да се достиже широк опсег редокс потенцијала (од -0,5 до +0,6 V). Формирани асоцијати гвожђа са дозор атомима лиганата су најчешће са координационим бројем метала 6 (Crichton, 2008).

Гвожђе у живом свету

Гвожђе је есенцијални елемент за људе и заступљен је у организму везан за различите протеине: протеине који садрже хем (хемоглобин и миоглобин), гвожђе-сумпорни протеини задужени за трансфер електрона и др. Сходно овоме, гвожђе утиче на велики број биохемијских процеса у организму. У појединим ензимима (неке

монооксигеназе), за време каталитичког циклуса, постоји високо валентно интермедијерно Fe(IV) и Fe(V).

У биљном свету гвожђе се налази у протеинима хлоропласта, утиче на синтезу хлорофила, директно је укључено у метаболизам нуклеинских киселина, а његови органски комплекси су укључени у реакције преноса електрона у процесу фотосинтезе. Висок степен оксидације једињења гвожђа, његова преципитација на карбонатима и/или фосфатима и конкуренција катјона метала у траговима са Fe^{2+} јонима, за везивање у хелатним једињењима утичу на мањи степен уноса гвожђа од стране биљака (Kabata-Pendias, 2000).

2.2.5. Бакар

Бакар је елемент заступљен у земљиној кори око $10^{-4}\%$. Најчешће постоји у облику сулфида, али и у облику оксида и хидроксикарбоната (Filipović & Lipanović, 1985). Бакар је слабо покретљив елемент у земљишту јер лако преципитира са различитим анјонима (сулфидни, карбонатни или хидроксилни). Може се наћи и у облику полиоксо и хидроксо карбонатних комплексних једињења. Бакар је заступљен у земљишту, осим у облику минерала и у облику слободног јона и комплексним једињењима (нарочито комплексиран са органским лигандима) (Sanders & Bloomfield, 1980). Адсорпција бакарних јона од стране земљишних минерала зависи од рН средине. Процеси којима је омогућена фиксација овог елемента за земљишне конSTITUTE су: адсорпција, оклузија и копреципитација, хелатизација, комплексирање и фиксација микробима. Бакарни јони се чврсто везују за органске и неорганске компоненте земљишта. Везивање бакра за хуминске киселине и друге компоненте органске материје земљишта је важан фактор који одређује његову доступност, транспорт и токсичност (Kostić *et al.*, 2011).

Према електронској конфигурацији, бакар постоји у једињењима у природи у два оксидациона стања: +1 и +2. Доминантно оксидационо стање бакра је +2, а јон Cu^{2+} има изражену тенденцију да формира комплексне асоцијате или да се окружује N и O донорским атомима присутних молекула различите уређености, најчешће квадратно планарне или деформисане октаедарске структуре. У биолошким системима може имати тетраедарску координацију. Cu(II) је „тврда“, а Cu(I) „мека“ киселина.

Бакар у живом свету

Као есенцијални биометал, бакар је кофактор бројних ензима преко којих учествује у различитим биохемијским процесима. Посебно су интересантни ензими који учествују у детоксикацији организма и елиминацији реактивних кисеоничних врста и слободних радикала ($O_2^{\cdot-}$, O_2^{2-} , $OH^{\cdot}$, OH^- , $HO^{\cdot}$). Јони бакра постоје као кофактори у ензимима, имају функцију у транспорту електрона, учествују у фотосинтези, дисању, дистрибуцији угљених хидрата, контролишу стварање ДНК и РНК и др. Интрацелуларне количине слободног бакра у живим организмима су на врло ниском нивоу концентрација и до циљних протеина транспортују се помоћу бакар хаперон протеина (Crichton, 2008).

У биљном свету бакар улази у ткиво корена биљака у растворном јонском облику, а у корену постоји у форми растворних комплекса. Бакар има мању мобилност у односу на остале биоелементе и акумулира се у корену и лишћу. Мање количине бакра су присутне у зеленим ткивима биљака, вероватно везане у пластоцијанин и протеинске фракције, док је његова акумулација забележена и у репродуктивним ткивима биљака. Присуство овог биометала утиче на пропустљивост ксилема за молекуле воде, редукцију и фиксацију азота из земљишта (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

2.2.6. Манган

Манган је десети елемент по заступљености у земљиној кори, просечан ниво овог метала у литосфери је 0,085%. Јавља се углавном у облику оксида, хидратисаних оксида, у траговима у силикатима и као пратилац руда гвожђа (Filipović & Lipanović, 1985). Понашање мангана у површинским депозитима зависи, пре свега, од оксидо-редукционих услова и киселости средине (Eh-pH). Манганова једињења се могу лако оксидовати и редуковати, па оксидациони услови земљишта могу јако смањити доступност мангана, док редукциони услови могу подићи ниво доступности овог метала скоро до токсичних граница (Kabata-Pendias, 2000). Манган у земљишном раствору је углавном комплексиран са органским лигандима (Hodgson *et al.*, 1966), док манган у површинским слојевима земљишта има изразиту тенденцију за везивање за фулвинске киселине (Godo & Reisenmauer, 1980). Могућност мангана да формира анјонске комплексе и комплексе са органским лигандима, може повећати његову растворљивост у алкалном земљишту.

У природним условима најзначајнија оксидациона стања мангана су +2, +3 и +4. Стабилан Mn^{2+} јон јавља се у карбонатима и силикатима у којима може да замени гвожђе и магнезијум (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

Манган у живом свету

Манган има есенцијалну улогу у детоксикацији организма од реактивних кисеоничних врста, као кофактор ензима каталазе, пероксидазе и супероксидисмутазе (Crichton, 2008). Двовалентни јон овог метала је укључен у процес експресије гена, стабилизовање ДНК структуре (Munno De *et al.*, 1996). Метаболизам, мангана је блиско повезан са метаболизмом гвожђа (Momčilović, 2004), па је овај метал активатор ензима који контролишу метаболизам угљених хидрата, протеина и липида и метаболизам азота.

Осетљивост на манган је различита за различите биљне врсте (Andersson, 1987). Преузимање мангана од стране биљака је метаболички контролисано. Уколико је манган присутан у земљишном раствору у високим концентрацијама, онда се дешава и пасивна апсорпција овог метала. Концентрација мангана у биљкама показује негативну зависност од базности земљишта (осим за кречњачко земљиште са рН већим од 8) и позитивну зависност са земљишном органском материјом. Овај метал се кроз биљку транспортује у облику Mn^{2+} , а његов садржај у биљкама зависи од карактеристика саме биљне врсте и од резерви расположивог мангана (Kabata-Pendias, 2000).

Двовалентни јон мангана и у биљкама учествује као кофактор у катализама. Важна карактеристика овог јона јесте да је он слична, али не и тачна, замена за Mg^{2+} јон. У том смислу, Mn^{2+} јон се врло лако замењује са Mg^{2+} јоном у истој координацији, окружењу и структури. Манган вероватно учествује у развијању молекулског кисеоника у фотосинтези и игра важну улогу у преносном систему електрона у процесу фотосинтезе (Watanblet *et al.*, 1990).

2.2.7. Хром

Хрома у земљишту има мање него мангана, па се у земљиној кори налази око 0,03%, у стенама богатим силикатним минералима, гвожђем и магнезијумом или у облику мешовитог оксида заједно са гвожђем. Особине хрома у земљишту зависне су од Eh-pH вредности система (El-Bassam *et al.*, 1975). Геохемија Cr је комплексна због могућности да постоји у различитим оксидационим стањима, која зависе и од присуства других метала, посебно једињења мангана (Bartlett & James, 1979). Лако

моби́лан хроматни анјон CrO_4^{2-} се може једноставно сорбовати на глинама или хидратисаним оксидима (Griffin *et al.*, 1977). Тривалентни јон Cr је слабо моби́лан у слабо киселим срединама, на $\text{pH}=5,5$ скоро потпуно преципитира, па су његова једињења врло стабилна у земљишту. Pacha *et al.* утврдили штетан утицај тривалентног јона хрома на биохемијску активност земљишта (Pacha *et al.*, 1988). У истим условима, Cr^{6+} јон је врло нестабилан у земљишту и лако моби́лан. Хром се лако сорбује на органској материји земљишта, па је концентрација хрома у земљишту зависна од садржаја органске материје (Anđelković *et al.*, 2011).

Редукциони и адорпциони процеси у земљишту одређују понашање хрома и његов пренос у систем земљиште – биљке.

Тривалентни јон хрома у воденом раствору има изразиту тенденцију да са различитим, пре свега анјонима органских киселина, као лигандима формира врло стабилне комплексне асоцијате или продукте комплексирања. У минералима може бити супституент за тривалентно гвожђе и алуминијум, обзиром на сличан јонски радијус.

Хром у живом свету

Нема података о постојању ензима који у себи садрже јоне овог метала. Постоје, међутим, индиције да се хром излучује као олигопептид хромодулин (садржи четири атома хрома) и да има функцију у деловању инсулина (Crichton, 2008).

Нема података о есенцијалној улози хрома у метаболизму биљака, али се у већини истих овај метал може детектовати на нивоу трагова. Садржај хрома у биљкама углавном је контролисан растворљивим садржајем хрома у земљишту. Ниво преузимања хрома од стране биљака зависи од типа земљишта и самих биљних врста. Висока концентрација хрома примећена је у корену, лишћу или изданцима, при чему је најмања концентрација у зрну. Ипак се чини да су механизми апсорпције и транслокације хрома у биљкама слични онима код гвожђа, што се рефлектује на сасвим стабилан однос Cr/Fe у биљним ткивима (Carlisle *et al.*, 1974).

Интересовања за проучавање хрома у биљном свету порасла су са открићем да исти учествује у метаболизму глукозе и холестерола (Schroden, 1962). повећање садржаја хрома у биљкама узрокује смањење садржаја скоро свих нутриената у врховима биљака, а само појединих у корену. Антагонистичка интеракције између Cr и Mn, Cu и B биле су уочене од стране (Tuner & Rust, 1971). У неким случајевима се примећује и синергистичко дејство између хрома и гвожђа (Kabata-Pendias, 2000).

2.2.8. Олово

Олово је халкофилни елемент, те се у природи чешће јавља у облику сулфида, али и у облику карбоната и сулфата. Може бити присутно у оксидационим стањима +2 и +4. Под дејством различитих временских услова, сулфиди олова полако оксидују и прелазе у карбонате, након чега се могу инкорпорирати у минерале глине, оксиде Fe и Mn, или везати за органску материју. Олово је углавном у земљишту локализовано у површинским слојевима захваљујући високој концентрацији органске материје у овим слојевима земљишта и реакцији олова са хуминским и фулвинским материјама (Kostić *et al.*, 2011). Висока вредност pH може утицати на преципитацију олова у виду хидроксида, фосфата и карбоната или на формирање стабилних органских комплекса. Повећана киселост земљишта повећава растворљивост олова. Према геохемијским карактеристикама, Pb^{2+} јон сличан је двовалентним катјонима земноалкалних метала, те има способност да замени Ba, Sr, па чак и Ca у минералима или на местима за сорпцију. Природни садржај олова у земљишту потиче од стена. Ипак, због распрострањеног загађивања површинског слоја земљишта овим металом, веома је тешко разграничити количину олова која природно постоји у земљишту, од оне фракције доспеле антропошким утицајима (Kabata-Pendias, 2000).

Олово у живом свету

Олово није биоелемент, већ је токсичан и утиче на биохемијске процесе, реагујући са биомолекулима преко слободних SH група, чиме утиче на њихову инактивацију (Saraymen *et al.*, 1998; Jarosinska *et al.*, 2004; Mansouri & Cauli, 2009). Овај метал има кумулативни ефекат и у условима хроничне интоксикације и континуираног уноса преко ланца исхране постаје супституент за есенцијалне биметале у људском организму. На основу сличних физичко-хемијских карактеристика, Pb(II) јон може заменити Ca(II) у хидроксиапатиту минералног ткива, што доводи до његовог нагомилавања у зубима и костима (Mahaffey *et al.*, 2000). Pb(II) јон може да се акумулира и у мозгу, јетри и бубрезима. Утврђено је да дефицит гвожђа повећава степен апсорпције других двовалентних катјона, нарочито олова (Wright *et al.*, 1999; Bradman *et al.*, 2001; Choi & Kim, 2003). Олово се најчешће и највише уноси у организам путем хране, нарочито путем биљака кроз ланац исхране. Мерење нивоа олова у крви најбољи је показатељ садржаја овог метала у организму. Олово у крви као биосистему инхибира активности SH-зависних ензима који су укључени у синтезу хема, јер садржај хемоглобина (Hb) у крви постаје нижи када је концентрација олова у

крви висока (Bergdahl *et al.*, 1999). Повећани садржај нивоа олова, може да угрози биосистем крви јер у њој инхибира еритропоезу инхибирањем синтезе протопорфирина. Унос овог метала могућ је и преко ваздуха (Jakovljević & Pantović, 1991).

Олово је и за биљке токсичан метал. Преузимање олова од стране корена биљака је пасивно и смањено је на нижим температурама и у присуству кречњака (Zimdahl, 1875; Hughes *et al.*, 1980). Уколико је олово у земљишту присутно у растворљивом облику, корен биљке је у стању да преузме велике количине овог метала, те се исти нагомилава у корену, а мале количине се даље транспортују кроз биљку (Kabata-Pendias, 2000).

2.3. БИОМАТЕРИЈАЛИ

Целине које представљају биосистеме су: биљке, животиње и људи. Биоматеријали би били дефинисани као делови појединих биосистема. У ширем смислу, биоматеријал може бити сваки материјал који је биолошког порекла: биљни, анимални, хумани. Биоматеријали могу природни или синтетисани у лабораторији (полимери, керамика, композитни материјали). То могу бити материјали или супстанце, креирани као имплантанти и замена за поједине структуре (ткива, органе или функције) у живом организму (en.wikipedia.org). Сходно овоме, дентин се сматра биоматеријалом; постоје истраживања о употреби дентина као биоматеријала за регенерацију костију (Murata *et al.*, 2011.). Крвни систем се такође може сматрати биоматеријалом. Различите форме природних производа могу бити биоматеријали (Ige *et al.*, 2012.), па се ширем смислу, биљна врста *Cannabis sativa* као производ природе, такође може посматрати као биоматеријал.

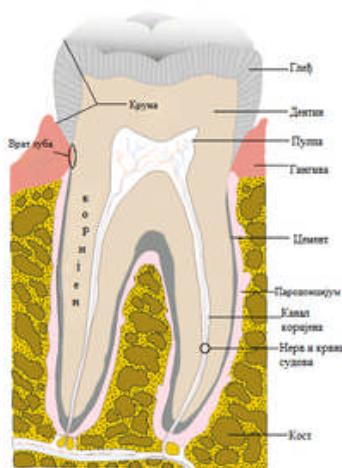
Сви биоматеријали могу интераговати са околном средином (Williams, 1987.). Степен и врста интеракције зависи од врста система који су међусобној спрези. Интеракције су динамичке промене у виду физичких, хемијских и биолошких процеса. Један од процеса јесте миграција метала, посебно фаворизирана уколико метали оставрују интеракцију са компонентама биоматеријала.

2.3.1. Зуби

Зуби су калцификовани орган, који се налази у усној дупљи, на почетку дигестивног тракта (Martinović, 2000).

Грађа зуба

Зуб се састоји од три чврста ткива: глеђи, дентина и цемента. Унутар зубне пулпе налазе се крвни судови, нерви. У квантитативном погледу, дентин је најзначајније зубно ткиво. У пределу крунице, дентин се налази између глеђи и пулпе. У пределу корена, од дентина ка спљашњости је цемент, док је унутрашњости коренска пулпа. (Слика 2.3.1.) (Martinović, 2000).



Слика 2.3.1. Грађа зуба (Martinović, 2000)

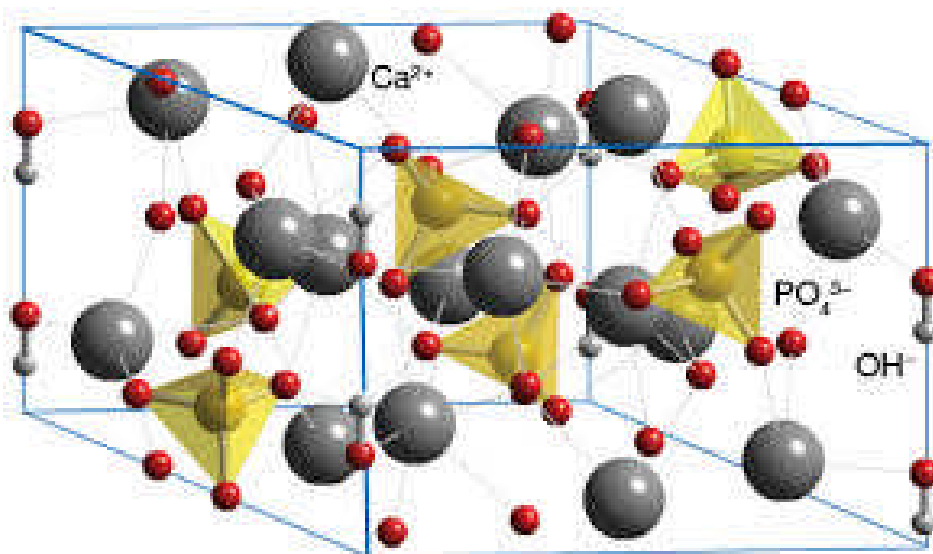
Зубна глеђ покрива спољашњи део зубне крунице и садржи 36% калцијума и 17% фосфора од укупног тежинског садржаја. У дентину је садржај поменутих елемената: 27% и 13%, (Jenkins, 1978). Поред доминантног неорганског садржаја, зубно ткиво садржи органску материју и мањи проценат воде.

Применом дифракције X зрака, а посебно електронске микроскопије, утврђено је да се главне компоненте неорганског садржаја глеђи, дентина и костију налазе у облику кристала апатита. Величина кристала у наведеним чврстим ткивима може да варира и зависи од брзине кристализације. Генерално, велики кристали настају спором кристализацијом (Bergslien *et al.*, 2008).

Хемијска природа кристала апатита

Калцијум и фосфор се у глеђи и дентину се налазе у облику кристала хидроксиapatита (НА). Састав апатита се изражава емпиријском формулом $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{X})_2$, где X може бити OH^- , F^- , Cl^- или CO_3^{2-} јон (Kannan *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2008) односно формулом апатита $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}\text{H}_2\text{O}$, где X може имати вредности од 0 до 2. На слици 2.3.2. је представљена структура овог минерала.

Апатит припада систему хексагоналних кристала код којих су јони Ca^{2+} распоређени стубно и аксијално, тако да чине троугласте творевине под углом од 60° , од којих по две суседне формирају шестоугао. Унутар троугла је хидроксидни или флуоридни јон. Фосфор је у кристалу апатита у виду фосфатне групе, централно распоређен и окружен са четири кисеоникова атома у квадратној координацији. Између две фосфатне групе налази јон калцијума (Слика 2.3.2.) (Meyers *et al.*, 2008).



Слика 2.3.2. Структура минерала апатита; већи сиви јон: Ca^{2+} , жути тетраедар: PO_4^{3-} , мањи сиви јон: OH^- , црвени атом: O (Meyers *et al.*, 2008).

Однос Ca/P је 2.0 у зубу. Снижавање овог односа води ка тзв. калцијум дефицитарном апатиту и може настати: 1) адсорпцијом вишка фосфата у облику хидрогенфосфата, 2) супституцијом калцијумових јона јонима других метала, 3) одсуством неких калцијумових јона чиме је поремећена равнотежа између позитивног и негативног наелектрисања, те се дешава настајање хидрогенфосфатног јона уз истовремено ослобађање хидроксилне групе (Anđić, 1990). Измене у саставу овог односа указују на дијагенезу (Castro *et al.*, 2010) у *in vivo* условима и потенцијално у

природној средини у којој се налази антропогени материјал. Могућност измене јона је знатно већа на површини кристала.

Низак количник Са/Р условљава слабији квалитет апатита. Сматра се да у минерализованим ткивима постоје наизменични слојеви апатита и октакалцијум фосфата (ОСР). Како је октакалцијум фосфат нестабилан и подложен хидролизи, највероватније је прелазна структурна форма која се може хидролизovati у хидроксиapatит. Ова хидролиза не мора увек бити потпуна (Anđić, 1990; Kalićanin, 2006).

Кристалност апатита

Под овим појмом се подразумева квалитет апатита, обзиром на то да се у кристалима ове минералне структуре срећу извесни дефекти. До дефеката долази због одсуства појединих јона из кристалне решетке. Уколико у кристалима има мало дефеката и ако су кристали велики, називају се кристалима велике кристалности и обрнуто. Показало се да присуство јона Mg^{2+} и CO_3^{2-} у околини у којој се формира апатит, може поспешити раст малих кристала, док насупрот томе присуство флуоридног јона доприноси формирању већих кристала и у знатној мери утиче на хемијске и физичке особине кристала (растворљивост и способност преузимања других јона) (Prieto-Castelló *et al.*, 2007) и степен кристаличности (Greene *et al.*, 2004).

Остали неоргански састојци глеђи и дентина

Остали састојци глеђи и дентина су минорног садржаја и резултат су интеракција зубног ткива са оралним течностима и храном:

- Pb, F, Zn, Fe (висока концентрација на површини глеђи а мања у унутрашњим слојевима) (Kalićanin & Nikolić, 2011),
- Na, Mg, CO_3^{2-} (нижа концентрација у површинским, а већа у унутрашњим слојевима) (Porter *et al.*, 2005),
- Sr, Cu, Al, K (елементи са равномерном дистрибуцијом) (Kalićanin & Nikolić, 2010).

Органске материје зуба

Дентин се карактерише високим садржајем органских материја. Највећи део његовог органског садржаја чини колаген (око 18% суве материје). Колаген није хомогено распоређен у дентину; у спољним слојевима га има највише. Колаген из дентина садржи и липиде, цитрате и неколагенски матрикс (Kinney *et al.*, 2001). Дентин и цемент имају фибриларну структуру која потиче од колагена, што је утврђено

ектронском микроскопијом. Колаген се састоји од троструког полипептидног ланца – троструког хеликса (Linde & Robins, 1988).

Колаген садржи и угљене хидрате у облику кратких дисахаридних ланаца и протеогликана: хијалуронска киселина, хондроитин-сулфат и кератин сулфат (Bertassoni *et al.*, 2012).

Глеђ зуба садржи врло мало органске материје у облику протеина.

Минерализација зуба

Према литературним подацима минерализација зуба започиње у средини колаген - хондроитин сулфат - раствор засићен калцијумовим и фосфатним јонима најпре преко CaHPO_4 који даље преципитира а потом се претвара у апатит. Колаген може бити центар кристализације уколико су његова влакна међусобно повезана тако да постоје зоне везивања на сваких 64 nm. Нарушавањем ове структуре (дејством киселина, база или температуре), колаген губи способност везивања минерала калцијума и фосфора.

У неким ткивима колаген може минерализовати, а у другим не може. Колаген не минерализује уколико је простор између колагених влакана мањи од 0,6 nm обзиром на то димензије фосфатног јона 0,4 nm и његову просторну оријентацију. Хондроитинсулфат може бити и инхибитор минерализације, јер преко сулфатних група може везивати јоне калцијума и ставарати њихов дефицит према фосфатним јонима, (Andić, 1990). Аморфни калцијумхидроген-фосфат, који је растворљивији од хидроксиапатита, трансформише се у процесима раста, сазревања кристала и рекрисатлизације.

Промене у саставу апатита

У контакту зуба са оралним течностима, долази процеса који воде ка измени Ca^{2+} јона са катјонима M^{2+} (Kaličanin, 2006). Степен измене јона конституената у хидроксиапатиту другим јонима зависи од јачине интеракције између катјона и кисеоника из околне средине, као и од јонског потенцијала (Wopenkia *et al.*, 2005; Matsunaga *et al.*, 2008). Глеђ се, као компактна целина, састоји од више атома или атомских група, док према спољној средини доминира негативно наелектрисање. Негативна наелектрисања у глеђи потичу од фосфатних група и то оних које су изнад равни калцијумових јона у кристалној решетки. Због овога је могућа је адсорпција позитивних јона. Адсорпција негативних јона је такође могућа јер сви калцијумови јони нису сасвим прекривени фосфатним групама, те могу привлачити анјоне. На кристалу хидроксиапатита постоји слој адсорбованих јона (катјона и анјона) који услед

промене pH могу бити десорбовани. На адсорбовани слој анјона и катјона везује се слој воде – тзв. хидратациони слој који поспешује отпорност глеђи на разна оштећења (Anđić, 1990).

На основу резултата досадашњих испитивања, утврђено је да се између јона кристалне решетке апатита и спољне средине може изменити и до 1/3 укупног броја јона хетеројонском и изојонском изменом. У хетеројонској се Ca^{2+} јон мења разнородним катјонима: Na^+ , Mn^{2+} , Sr^{2+} , H_3O^+ . Према литературним подацима Ba^{2+} и Pb^{2+} јони могу потпуно, а јони Cd^{2+} и Sr^{2+} делимично заменити калцијумов јон у синтетисаном хидроксияпатиту (Sugiyama *et al.*, 2000; Sugiyama *et al.*, 2002; Jasukawa *et al.*, 2008). У изојонској измени Ca^{2+} из кристалне решетке замењује се калцијумовим јоном из околине преко оралних течности. Јонска измена постоји и на анјонском нивоу, под условом да се не ремети стехиометријска равнотежа имајући у виду различита наелектрисања јона. У литератури већ постоје подаци о променама које се дешавају на минералном ткиву костију које су изложене дејству околне средине (нпр. земљиште) у виду миграције елемената у систему: земљиште – минерално ткиво костију (Castro *et al.*, 2010; Shinomiya *et al.*, 1998). У системима земљиште (као природна средина) – антрополошки материјал одвијају процеси: адсорпција, десорпција, дифузија, јонска измена, преципитација, копреципитација и промена степена кристалности неорганске материје (Patonai *et al.*, 2013). Оваква испитивања су већ примењена за одређивање времена смрти, што је потенцијално битно у форензици (Vass *et al.*, 1992; Yoshino *et al.*, 1991). Интензитет миграције јона метала која се дешава у и из минералног ткива може бити индикатор времена изложености некој средини, као и врсти средине. Нема довољно литературних података о променама на минералном ткиву зуба у аналогним системима.

2.3.2. CANNABIS SATIVA L.

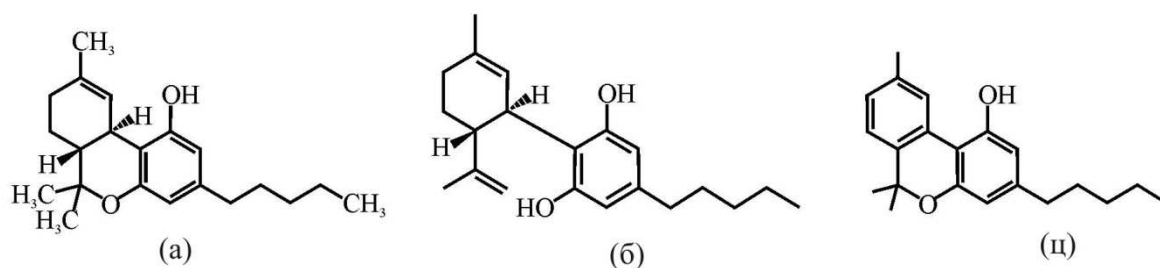
У већини земаља у свету Cannabis sativa L. је законом санкционисана биљна врста. Широко је забележена злоупотреба ове биљне врсте као наркотика. У многим европским земљама је забележено постојање домаће производње ове биљне врсте (EMCDDA 2010). Како је наглашено од стране Eboh & Thomas (2005), лишће, цветови, семе и стабло биљке cannabis могу бити злоупотребљени и коришћени као психоактивна материја. Према Националној стратегији за борбу против дрога у Републици Србији, око 15,9 тона ове дроге је заплењено на територији Републике

Србије за период од 2008. до 2009. године. (Министарство здравља Републике Србије 2009). Ова количина представља збир количина које су заплењене и произведене у Србији. Канабис се у Србији производи илегално на отвореном пољу, али и у строго контролисаним условима у затвореном простору. Тренутно важећом законском регулативом, канабис је забрањена материја на територији Републике Србије.

Власти у свим земљама се срећу са тешкоћама у одређивању порекла производње ове биљне врсте. Изналажење могућности одређивања порекла канабиса је давно почело; Coffman & Gentner (1975) су мерили концентрације 15 елемената биљке канабис и корелирали су их са садржајем у земљишту и садржајем канабиноида. Иако су пронађене неке корелације, оне су ипак могле бити измењене под дејством различитих утицаја, те стога нису могле бити употребљене за одређивање порекла канабиса. Однос изотопа угљеника и азота су у корелацији са растом ове биљне врсте и могу бити значајни индикатори порекла (Liu *et al.*, 1979; Denton *et al.*, 2001; Shibuya *et al.*, 2006). Упркос покушајима, техника одређивања порекла канабиса још увек није практично примењена (Shibuya *et al.*, 2007).

Cannabis sativa L. је једногодишња биљка која припада породици *Cannabaceae*. Канабис је у употреби већ око пет хиљада година у медицинске сврхе или као интоксикант. Ова биљка има различите варијетет који се морфолошки разликују. Разликују се и по хемијском саставу и присуству појединих група једињења (Ковачевић, 2002). Канабис је врло комплексна врста и садржи велики број различитих једињења која могу да интерагују међусобно, услед чега је хемија ове биљне врсте врло комплексна. Ови конституенти су из свих класа хемијских једињења: моно- и сексвитерпени, угљени хидрати, стероиди, флавоноиди, аминокиселине и друга једињења која садрже азот. Најпознатија и најспецифичнија класа једињења јесу C_{21} терпенофенолни секундарни метаболити који се зову канабиноиди, од којих је (-)- Δ^9 -trans-(6aR, 10aR)-тетрахидроканабинол (Δ^9 -ТНС) највише психоактиван. До 2005. године је детектовано 70 различитих канабиноида који су подељени у једанест различитих типова. Проналазак и развој синтетичких канабиноида, промовисао је нови назив за поменућу класу једињења: фитоканабиноиди (ElSohly *et al.*, 2005). Последња истраживања показују да је број биљних канабиноида већи, чак најмање 90 (Fischedick *et al.*, 2010). Настајање канабиноида у биљци одвија се реакцијама које су ензимски контролисане. Ензими који катализују процесе конверзије канабигерола у канабидиол и тетрахидроканабинол су већ изоловани (De Meijer *et al.*, 2003). Утврђено је да се канабиноиди стварају у биљци биосинтетским путем у облику својих деривата

канабиноидних киселина (Fischedick *et al.*, 2010). Ове киселине деградирају у канабиноиде у току стајања или током загревања (Taura *et al.*, 2007). Велики број биотичких и абиотичких фактора утиче на синтезу канабиноида, укључујући пол биљке, старост, дужину утицаја дневног и UV светла, температура ваздуха, доступност нутриената биљци (Hilling & Mahlberg, 2004). Садржај канабиноида у различитим деловима биљке варира: корен садржи само трагове једињења из класе канабиноида а стабло и гране садрже нешто већи проценат канабиноида од корена. Садржај канабиноида у лишћу је врло изражен и варира зависно од позиције листа на стаблу – лишће ближе кореновом систему има мањи садржај канабиноида од лишћа у горњем делу стабла (Pate, 1994). У форензичком смислу, најзначајнији канабиноиди за истраживање су: тетрахидроканабинол (Δ^9 -THC), канабидиол (CBD) и канабинол (CBN) (Слика 2.3.3.).



Слика 2.3.3. Формуле канабиноида: а) тетрахидроканабинол, б) канабинол и ц) канабидиол

Cannabis sativa L има способност акумулације тешких метала у све своје делове (Linger *et al.*, 2002). Акумулација метала из земљишта у биљкама зависи од доступности метала у земљишту. Тако ће биљке које су узгајане на контаминираној подлози имати већи садржај метала од дозвољеног (Khan *et al.*, 2008). Prasad (2004) је објавио да различите биљке акумулирају различите концентрације појединих метала. Преузимање, акумулација и транслокација метала у биљкама може да варира зависно од метала и врсте биљке. Баланс минерала у земљишту вероватно утиче на биосинтезу канабиноида, обзиром на то да је утврђено да различите концентрације К, Р, Са и N имају утицај на садржај Δ^9 -THC, CBD, Δ^8 -THC и CBN (Haney & Kutched 1973).

2.4. МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ -БИОМАТЕРИЈАЛИ

Структурна карактеризација медијума извршена је употребом микроскопије и инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) са циљем добијања података о структури анализираних медијума, док је структурна карактеризација биоматеријала извршена применом стереомикроскопије, инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), Рентгенске дифракције (XRD) и скенирајуће електронске микроскопије (SEM-EDS). Скенирајућа електронска микроскопија је примењена и за праћење потенцијалних интеракција насталих у проучаваним биосистемима.

За потребе квантитативне анализе садржаја биометала у земљишним и воденим медијумима као и у испитиваним биоматеријалима коришћене су индуктивна спегнута плазма – оптичка емисиона спектроскопија (ICP-OES) и атомска апсорпциона спектроскопија (AAS).

Квантитативно и семиквантитативно одређивање органских једињења у биоматеријалима извршено је употребом хроматографских метода: гасне хроматографије са пламенојонизујућом детекцијом (GC-FID) и танкослојне хроматографије (TLC).

2.4.1. Стереомикроскопска карактеризација медијума и биоматеријала дентина

Микроскопија је неструктивна физичка метода којом се, под различитим увећањима, могу детектовати морфолошке промене на материјалима или утврдити структурни садржај материје која се посматра. Микроскопија налази примену у многим пољима науке. Интензивно се користи у форензици за различите врсте анализа: анализа микротрагова влакана тканине, боја и премаза, земљишта,...

2.4.2. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR)

FT-IR спектроскопија је погодна, неструктивна техника и има широку примену у проучавању структурних карактеристика материјала, без претходног нарушавања његове основне структуре услед припреме за анализу.

Зависност промене интензитета пропушеног инфрацрвеног зрачења кроз неку супстанцу од фреквенције (и/или таласне дужине) зрачења представља инфрацрвени спектар; она се изражава обично у процентима као трансмитанца (T) и представља количник пропушеног (I) и упадног зрачења (I_0). Положај апсорпционог максимума зависи од фреквенције вибрације хемијске везе, а интензитет вибрације зависи од величине промене диполног момента хемијске везе. Најинтензивнији максимуми у IR спектрима потичу од апсорпције поларних веза. Како је изглед IR спектра (положај, интензитет, број и облик апсорпционих максимума) у директној вези са структуром молекула, то је он карактеристика сваког једињења. Из ових разлога IR спектроскопија налази примену у идентификацији органских једињења и идентификацији функционалних група (Milosavljević, 1998).

Ова техника налази примену и у неорганској хемији - у проучавању комплексних једињења и идентификацији различитих неорганских анјона (карбоната, хидроген карбоната, сулфата, фосфата...) у саставу различитих једињења (Nakamoto, 2009).

Техника је изузетно корисна за праћење деградационих ефеката органских киселина на чврсто минерално ткиво зуб, јер FT-IR спектар јасно показује опадање интензитета трака које потичу од фосфатних вибрација хидроксиапатита у зубу који је третиран органским киселинама (Nikolić *et al.*, 2011).

Упоредна анализа природних зуба, хидроксиапатита као комерцијалног денталног материјала и металокерамичких круница је врло ефикасна применом FT-IR спектроскопије (Kaličanin, 2006).

Trueman *et al.* (2004) је примењивао FT-IR спектроскопију за испитивање минералног састава костију и промена које су на њима настале након што су исте биле одложене дужи низ година у земљишту. Ова врста спектроскопије је коришћена за карактеризацију костију и детекцију калцита и хидроксиапатита у костима, као и за одређивање односа органске и минералне материје.

У форензичким испитивањима, ова аналитичка техника има широку примену у идентификацији и карактеризацији различитих форензичких узорака.

Органска материја у земљишту анализирана је за потребе криминалистичке истраге уз употребу FT-IR спектроскопије тако што је извршено поређење резултата анализе спорних и неспорних узорака замљишта (Cox *et al.*, 2000).

FT-IR спектроскопија је нашла примену у карактеризацији састава полимера акрилних влакана у циљу квалитативне идентификације синтетичких влакана тканине и поређења (Causin *et al.*, 2005).

У идентификацији психоактивних контролисаних супстанци, ова спектроскопска техника је широко примењена пре свега због тога што је поуздана, нарочито у случају чистих супстанци (UNODC Manuals, Guidlines and Publications). У идентификацији супстанци ова аналитичка техника је категорисана као метода категорије „А“. У случају да узорци представљају смеше, применом ове технике добија се спектар смеше, што може отежати идентификацију неке од компонената у смеси услед преклапања пикова (SWG Drug Recommendations).

2.4.3. Рентгенска дифракциона спектрометрија (XRD)

Рентгенска дифракциона спектрометрија је недеструктивна и једна од најмоћнијих аналитичких техника за идентификацију непознатих кристалних супстанци и одређивање структуре материјала. Ова аналитичка техника је категорисана као метода категорије „А“ (SWG Drug Recommendations).

XRD захтева релативно малу количину материјала (Jenkins & Snyder, 1996).

Анализа узорка овом методом заснива се на Беговом закону. Дифрактограми се изражавају као зависност интензитета сигнала од угла 2θ (Ђорђевић *et al.*, 1985).

Поређењем позиција и интензитета дифракционионих пикова конкретних узорака у односу на библиотеку дифрактограма познатих кристалних структура, узорци непознатог састава могу бити идентификовани. Додатне информације у тумачењу дифрактограма даје и облик пикова. Наиме, што је боље дефинисана кристална структура, пикови су на дифрактограму ужи, интензивнији и боље дефинисани, док слабо изграђена кристална структура показује шире пикове мањг интензитета.

Овом аналитичком техником, могуће је идентификовати компоненте из смеше и извршити семиквантификацију (Bergslien *et al.*, 2008). Bergslien *et al.* (2008) су користили ову технику за идентификацију и разликовање кремираних остатака у односу на материјале који су коришћени у пракси као пуниоци и који у себи садрже калцијум карбонат, силикате или сулфате.

Prieto-Castelló *et al.* (2007) су применили ову технику и извршили одређивање појединих параметара који су повезани са степеном кристалности минералне компоненте у одређеним зонама кристалности костију. Утврђено је да у *post mortem*

процесу деградације, кости губе органску материју и да се степен кристалности хидроксиапатита повећава. Оваква врста анализе заједно са резултатима биохемијских истраживања је примењена у циљу одређивања *post mortem* интервала.

Wang *et al.* (2010) су истраживали степен кристализације костију и утицај адсорбоване воде на кристалну структуру минералног ткива костију. Резултати ових истраживања у будућности могу бити коришћени за креирање нових биоматеријала.

Применом рентгенске дифракције Liu *et al.* (2013) су утврдили да се кристалне карактеристике минералног ткива костију повећавају погодним третманима предметног ткива.

У свакодневном форензичком истраживању XRD налази примену у анализи великог броја различитих узорака: боје са аутомобила, зграда, алата, метала, металних оксида, хидратисаних оксида легура, експлозива, земљишта, абразива, нечистоћа у наркотицима, полиморфних форми и сложених кристала. Ова техника има велику предност у примени у форензици управо зато што је недеструктивна, те се након њене примене може наставити са применом других инструменталних техника (Kugler, 2003).

2.4.4. Скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом спектроскопија (SEM-EDS)

Скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом спектроскопијом је техника широко распрострањена и у употреби у различитим пољима науке. Електронска микроскопија се користи у циљу испитивања узорака, њихове топографије (изгледа површине), морфологије (облик и величине честица које чине узорак), састава узорка (присутни елементи и њихова релативна заступљеност) и добијања кристалографских информација (како су елементи распоређени у узорку).

Када се узорак бомбардује зраком електрона, електрони се избацују из атома на површину узорка. Слободна места у омотачу се попуњавају електонима са виших енергетских нивоа и X-зрак се емитује да направи равнотежу у енергетској разлици између два електрона. EDS детектор X зрака (или EDX) мери број емитованих X зрака наспрам њихове енергије. Енергија X зрака је карактеристика елемента са кога је тај X зрак емитован. У пракси се EDS користи за квалитативну елементарну анализу у циљу

утврђивања присуства елемента или његове релативне заступљености (Đorđević *et al*, 1985).

Ова метода је нашла примену у одрђивању елементарног састава земљишта у форензичким лабораторијама. Заједно са детекцијом боје земљишта, употребом светлосног микроскопа, одређивањем анјонског састава, употреба SEM-EDS омогућава поређење форензичких узорака земљишта којим се постиже разликовање иситх (Cengiz *et al.*, 2004).

У покушају одређивања термалних измена (топљење, декомпозиција, спаљивање) текстилних влакана такође је коришћена скенирајућа електронска микроскопија (Gubala, 1997). Влакна тканине су чест форензички материјал који представља микротраг и као таква су погодна за проучавање скенирајућом електронском микроскопијом и то у циљу утврђивања насталих морфолошких промена влакана, као и утврђивања исецања или кидања влакана.

Скенирајућа електронска микроскопија је коришћена као помоћна метода у одрђивању озледа насталих у унутрашњем делу лобање жртве, а у циљу утврђивања оружја којим је убиство извршено (Melki *et al.*, 2011).

Нарочит значај SEM-EDS има у карактеризацији и одрђивању честица заосталих после пуцања (GSR). Ова техника је искоришћена за одређивање заступљености одрђених класа поменутих честица у различитим врстама муниције. Хемијска анализа честица заосталих након пуцања помоћу ове методе би касније могла бити употребљена за групну идентификацију муниције (Brozek-Mucha & Jankowicz, 2001).

2.4.5. Индуктивно спрегнута плазма - оптичка емисиона спектроскопија (ICP-OES)

За одрђивање концентрације елемената који су у узорку присутни у траговима, користе се углавном технике базиране на атомској спектрометрији. Ове технике обухватају употребу електромагнетног зрачења које се апсорбује или емитује из атома узорка. Извор побуђивања може бити пламен, електрични лук или индуктивно спрегнута аргонска плазма.

Квалитативна анализа се заснива на специфичним атомским емисионим линијама за дати елемент. Таласне дужине спектралних линија су тачно дефинисане и строго специфичне за атом елемента који их емитује, па спектрохемијска анализа

представља најбољи начин за идентификацију свих метала, као и неких неметала. Једна од предности ICP-OES за извођење елементарне анализе јесте то што може да послужи за мерење скоро свих елементата у периодном систему. Ова аналитичка техника има добру осетљивост (реда величине 10^{-6} - 10^{-7} g) и широки опсег мерења. Лимити детекције су врло ниски ($\mu\text{g/l}$ – mg/l). Још једна предност ове технике јесте мултиелементарна квантитативна анализа за релативно кратко време у малој запремини узорка. ICP-OES се користи за одређивање укупне концентрације датог елемента у узорку, у опсегу од 1-100 mg/l (Ђорђевић *et al.*, 1985).

За квантитативну анализу примњују се углавном метода екстерне калибрације, као и метода стандардног додатка, како би се смањио утицај матрикса на мерење. Предуслов за примену методе је растварање узорка уколико је у чврстом стању. Уколико је немогуће узорак растворити у киселом воденом раствору, врши се ласерско топљење како би се добио аеросол који се директно распршује у плазму (Lindon *et al.*, 2000).

Shinomiya *et al.* (1998) су применили ову технику како би утврдили могуће размене елемената између минералног ткива костију и земљишта у којем су биле одложене у периоду од две године. Испитивали су укупно 16 елемената.

Brooks *et al.* (2006) су применом ICP-a, уз помоћ мултиваријантне статистичке анализе, успели да класификују кремиране посмртне остатке. Ова студија је била пилот пројекат у одређивању легитимитета кремираних и утврђивања постојања евентуално контаминираних остатака.

За одређивање садржаја метала у појединим деловима лековитих биљака употребљена је ова метода, са циљем успостављања корелације са садржајем метала у земљишту у којем је биљка била узгајана (Selvaraju *et al.*, 2011).

ICP-OES је корисна метода за форензичке анализе из области балистичких испитивања јер је нашла примену у анализи трагова других метала у олову муниције (Peters, 2002).

За потребе форензичке неорганске токсикологије, ова техника има широку примену у процени концентрација и профила неких елемената присутних у ткивима и телесним течностима изолованим након извршених обдукција, нарочито у случајевима сумњивог тровања неорганским једињењима (Lech & Lachowicz, 2009).

2.4.6. Атомска апсорпциона спектроскопија (AAS)

Атомска апсорпциона спектроскопија је аналитичка техника за квантитативну анализу метала и металоида. Заснива се на својству атома да апсорбује енергију одређене таласне дужине. После десолватације генерише се атомска пара. Пропуштањем зрачења долази до специфичне апсорпције и долази до смањења интензитета монохроматског зрачења. Детектором се региструје се апсорпциони сигнал. У беспламеним техникама улогу атомизера преузимају графитна кивета или кварцна цев. Интензитет апсорпције зависи од броја атома у основном стању.

Атомском апсорпцијом спектрофотометријом се могу непосредно одређивати сви они елементи чије се резонантне линије налазе у области од 190 до 850 nm (блиска ултравиолетна и видљива област спектра) и који се могу превести у основно атомско стање. Овим условима углавном одговарају метали. Квантитативна анализа се заснива на линеарној зависности степена апсорпције A од концентрације атома у основном енергетском стању.

Осетљивост и граница детекције апарата веома се разликују за поједине елементе. Ова разлика потиче од разлика између апсорпционих коефицијената елемената, али зависи и од особина елемента у процесима који се дешавају при довођењу у атомско стање.

Оптимална осетљивост и тачност могу се постићи када се, претходном оптимизацијом, тј. подешавањем најпогоднијих услова распршивања, састава и протока гасова, висине пламена и интензитета извора светлости.

Ова техника је искоришћена за квантитативну анализу тоталног садржаја елементата у различитим врстама биљака (Razic *et al.*, 2005; Razic *et al.*, 2006) у циљу извођења закључака и законитости о преузимању метала од стране биљака и њиховој дистрибуцији у органима биљака.

За потребе испитивања способности биљне врсте *Cannabis sativa* L. да буде обновљив извор за деконтаминацију земљишта, коришћена је ова техника за одређивање тешких метала у поједииним деловима наведене биљне врсте (Linger *et al.*, 2002).

Метода има и ширу примену у форензици, па је искоришћена за одређивање састава и форензичку компарацију спорних и неспорних узорака легура (R.C.M., 1974).

2.4.7. Одређивање параметара крви у биоматеријалу крвног ткива

Хематолошка анализа квантитативног одређивања крвних параметара у крви као биометријалу извршена је употребом аутоматског аналзатора (МЕС6318 К).

2.4.8. Одређивање садржаја органских једињења у биоматеријалу биљне врсте *Cannabis sativa*

Хроматографија омогућава раздвајање, изоловање, идентификацију и одређивање састојака смеша. Раздвајање се врши на основу процеса који се дешавају на граници две фазе које се не мешају. Једна фаза је стационарна и може бити порозно или гранулисано чврсто тело, течност, танак слој течности адсорбован на течном телу или јоноизмењивач. Друга фаза је мобилана и може бити гас или течност. Хроматографски процес састоји се у томе што се раствор смеше у мобилној фази пропушта кроз стационарну фазу, при чему долази до расподеле компонената смеше између мобилне и стационарне фазе. Овај прелазак компоненете из једне у другу фазу дешаваће се све док однос концентрација компоненте у стационарној (C_s) и мобилној (C_m) фази не достигне константну вредност (коефицијент расподеле– K), $K = C_s/C_m$.

Гасна хроматографија са пламено јонизујућим детектором (GC-FID)

Код гасне хроматографије непокретна фаза је течна или чвста, а покретна је гасовита и њу чине инертан носећи гас и паре једињења која се раздвајају. До раздвајања долази услед различитих растворљивости пара испитиваних једињења у датој течној фази. Овај вид хроматографије примењује се за анализу свих једињења која се могу без деградације превести у парно стање. Зависност јачине сигнала (y mV) од времена назива се гасни хроматограм. У условима доброг раздвајања, сваки максимум одговара једном једињењу и окарактерисан је временом задржавња (ретенционом временом) и површином. Гасна хроматографија има примену у квалитативној и квантитативној анализи. Предности употребе ове методе су: кратко трајање анализе, велика осетљивост детектора (10^{-9} до 10^{-14} g), једноставност руковања апаратом.

Квалитативна анализа гасном хроматографијом заснива се на поређењу ретенционог времена непознатог једињења са ретенционим временом стандарда (сертификовани референтни материјал), уз неопходан услов да су оба хроматограма

снимана под истим условима (температурни програм, проток, колона и апарат). Ова метода идентификације није прикладна за потпуно непозната једињења.

Квантитативна анализа гасном хроматографијом се заснива на чињеници да је интензитет GC максимума (површина испод максимума) пропорционалан концентрацији једињења (Milosavljević, 1998).

Гасна хроматографија је коришћена за одређивање садржаја три важана канабиноида у биљци *Cannabis sativa* са циљем класификације анализираних узорака у два хемијска фенотипа, а према различитим индексима класификације (Stefanidou *et al.*, 1998).

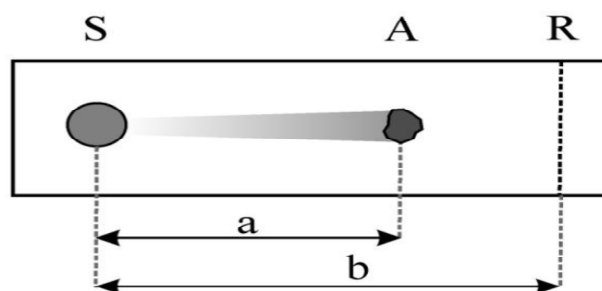
У случају форензичке анализе заплених узорака кокаина, француске и швајцарске власти су у својим лабораторијама, користећи два различита GC-FID уређаја, најпре спровеле оптимизацију аналитичких метода и онда поредиле резултате анализе узорака кокаина у циљу њиховог профилисања уз детектовање најпогоднијих једињења за ову сврху (метил естар екгонона, тропаккоаин, *cis*-и *trans*-цинамоил кокаин, норкокаин...) (Locicero *et al.*, 2007).

У циљу профилисања узорака хероина односно детектовања потенцијалних корелација које би упутиле на закључак да ли су узорци хероина међусобно истог или различитог порекла, примењена је метода гасне хроматографије са пламенојонизујућим детектором (Dufey *et al.*, 2006).

Анализа органских растварача заосталих у узорцима кокаина заплених на територији Француске извршена је применом ове инструменталне технике и применом статистичких софтвера. Циљ истраживања био је развој нове методе којом би се извршило одрђивање географског порекла узорака кокаина (Dujourdy *et al.*, 2008).

Танкослојна хроматографија (TLC)

Танкослојном хроамтографијом (TLC) врши се раздвајање компонената на хартији или плочици преко које је нанет слој чврстог адсорбенса. Проток мобилне фазе кроз танак слој остварује се капиларним продирањем кроз порозну средину. Брзине кретања тзв. зона или мрља, од којих свака представља једну издвојену компоненту, веома су важне за хроматографски процес, јер од њих зависи раздвајање компонената. Важна величина у подеаној хроматографији је R_f вредност (ретенциони фактор или фактор задржавања), која је карактеристична за сваку комоненту у дефинисаном хроматографском систему и служи за идентификацију комоненте у анализираној смеси. Дефинише се као однос пређеног пута компоненте (a) и пређеног пута раставарача(b): $R_f = a/b$ (Слика 2.4.1.)



Слика 2.4.1. Одређивање R_f вредности: S – старт; R – фронт раставарача;
a – пређени пут компоненте; b – пређени пут раставарача.

Највећу R_f вредност имаће компонента која има највећи афинитет ка мобилној фази. Сматра се да су комоненте добро раздвојене ако је $R_f > 0,05$ (Меденица & Малешев, 2002).

Танкослојна хроматографија је у широкој употреби у квалитативној анализи форензичких узорака: психоактивних контролисаних супстанци (Moffat *et al.*, 2011), експлозивних материја, боја текстилних влакана (Home & Dudley, 1981).

Форензичка анализа мастила подразумевала је коришћење танкослојне хроматографије у циљу упоређивања мастила на спорним и неспорним документима (Sherma *et al.*, 2008).

Хроматографско раздвајање мастила на боје конституенте, је приказано као као врло продуктивна метода приликом упоређивања влакана и приликом упоређивања хроматограма анализираних узорка са хроматограмима у постављеним базама (Djozan *et al.*, 2008).

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

За испитивање интеракција у системима **земљиште – биометали – биоматеријали** коришћени су земљишни медијуми: урбано градско земљиште, земљиште претежно глиненог састава, земљиште претежно кречњачког састава и хумусно земљиште. У циљу проучавања интеракција са биоматеријалима коришћени су и водени медијуми: комерцијална вода “aqua viva” и раствор модел кишнице. Биоматеријали: минерално коштано ткиво хуманих зуба и биљна врста *Cannabis sativa* су употребљени за испитивање интеракције са наведеним медијумима. Праћена је и интеракција олова са биоматеријалом крви.

Структурна карактеризација медијума извршена је применом микроскопије и FTIR. Структурна карактеризација биоматеријала минералног коштаног ткива извршена је употребом микроскопије, FTIR, XRD и SEM-EDS. За праћење потенцијалних интеракција насталих у проучаваним системима примењена је техника SEM-EDS.

Квантитативни садржај биометала у различитим медијумима и биоматеријалима одређиван је методама ICP-OES и AAS.

Праћење промена изабраних хематолошких параметара вршено је помоћу аутоматског анализатора.

Квантитативно и семиквантитативно одређивање органских једињења у биоматеријалу извршено је применом метода GC-FID и TLC.

Шематски приказ експерименталног рада је приказан на слици 3.1.1.

Lipomed (Аустрија): $\Delta^9\text{THC}$ 50 mg/mL у метанолу, CBD и CBN у чврстом стању чистоће $99,090\pm 0,199\%$ и $99,337\pm 0,018\%$. Радни раствори канабиноида у метанолу су припремљени у концентрацији 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 и 0,005 mg/mL за $\Delta^9\text{THC}$, CBD и CBN. Као извор олова коришћен је раствор соли олово-ацетата. Олово-ацетат је набављен од стране компаније компаније Merck (Немачка), чистоће *p.a.*

3.2. МОДЕЛ СИСТЕМИ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – МИНЕРАЛНО КОШТАНО ТКИВО ЗУБА

Модел системи за испитивање интеракција земљиште – биометали – минерално коштаног ткива зуба била су три различита земљишта: урбано градско земљиште – медијум I, земљиште претежно глиненог састава – медијум II и земљиште претежно кречњачког састава – медијум III (сва три типа земљишта су са подручја града Ниша и околине) и водени медијумима: комерцијална вода “*aqua viva*” – медијум IV и раствор модела кишнице – медијум V. Минерално коштаног ткива су хумани зуби екстрахирани из здравствених или ортодонских разлога на стоматолошкој клиници Медицинског факултета у Нишу.

У поменутих медијумима зуби су одложени у масеном односу 100:1, остављени да стоје у различитим временским интервалима до периода од три месеца на собној температури.

3.2.1. Припрема медијума и минералног коштаног ткива зуба за моделовање система

Са изабраних локалитета узорковано је 2 kg земље, 30 cm испод површине (Pansu & Gautheyrou, 2006). Од осушених узорака одмеравање су пробе (медијуми I, II и III), које су наквашене дејонизованом водом у стакленим чашама. Модел кишнице је направљен одмеравањем 0,0419 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6063 g KNO_3 ; 0,0276 g NaCl и 1,1179 g Na_2SO_4 у 100 mL дејонизоване воде. У даљем току припреме 0,05 mL оваквог раствора је растворено у 500 mL дејонизоване воде дајући модел раствор кишнице. Биоматеријал минералног коштаног ткива зуба је одлаган у наведеним медијумима у омасеним односима медијум : зуб = 100 : 1.

Референтни узорци медијума који нису били изложени интеракцији са биоматеријалима су сачувани за поређење садржаја биометала пре и после интеракције са биоматеријалима.

Екстраховани зуби (здрави делови дентина) су третирани физиолошким раствором, опрани дејонизованом водом и осушени до константне масе. Један део је одвојен за испитивања и остављен је да стоји у одговарајућим медијумима у различитим временским интервалима (до 3 месеца и до 6 месеци). Нетретирани делови зуба су чувани ван утицаја било каквих медијума као референтни узорци коштаног ткива.

3.2.2. Карактеризација медијума

Карактеризација медијума је извршена прорачуном садржаја органске материје (ОМ) за земљишне медијуме који је приказан као садржај органског угљеника. рН вредност је мерена за све медијуме на рН-метру Selecta. Сваки од земљишних медијума је најпре измерен по 50 g, пребачен у балон од 250 mL, додато је по 125 mL дестиловане воде уз интензивно мешање. Након таложења је извршено декантовање и мерење рН вредности у филтрату.

Стерео-микроскопска карактеризација земљишних медијума извршена је стерео микроскопом (LEICA MZ 16 A) у циљу добијања информација о структури земљишних медијума. Стерео-микроскопске слике су урађене са увећањима до 20 пута.

Структурна карактеризација земљишних медијума вршена је методом инфрацрвене спектrophотометрије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR).

4.2.3. Одређивање садржаја биометала

Миграција јона биометала (Cu, Fe, Zn, Ca и Mg) и олова (Pb) у модел системима земљиште (вода) – биоматеријал коштаног минералног ткива зуба испитивана је мерењем садржаја истих техником ICP-OES на почетку и на крају експеримента.

Након завршеног процеса интеракције (завршетка предвиђеног рока одлагања коштаног ткива зуба у одговарајућим медијумима), узорци зуба (третирани и референтни) су растварани у HNO₃, концентрације c=6 mol/L, настали суви остатак је третиран HCl исте концентрације, а затим растваран у дејонизованој води (Cazalbou *et*

al., 2004; Kalićanin *et al.*, 2004). Из раствора је одређиван садржај биометала. На исти начин је извршена припрема и анализа референтног узорка зуба који није подвргаван интеракцији са медијумима.

Земљишни медијуми су припремани за анализу садржаја биометала тако што су референтни узорци земљишта растварани у најпре у HNO_3 , концентрације $c=6 \text{ mol/L}$. Након филтрирања, филтрат је упараван до сува и растворен помоћу HCl и разблажен дејонизованом водом.

Из раствора је одређиван садржај биометала.

Референтни водени медијуми нису третиран пре одређивања садржаја биометала.

Садржај биометала у растворима медијума и узорцима биоматеријала зуба одређиван је на Spectroflame ICP-OES апарату у плазми аргона (снаге 2.5 KW и фреквенције 27.12 MHz). Концентрације су одређиване из калибрационе криве добијене снимањем референтних раствора предметних биометала. Један узорак следеће пробе који је садржао само азотну киселину упарену до сува и раствор хлороводоничне киселине за реконституисање је такође подвргнут мерењу.

3.2.4. Анализа система биометријал крв - олово

За потпуније сагледавање интеракција у систему биоматеријал – метали (Pb) анализирани су неки препознатљиви хематолошки параметри у условима хроничне интоксикације оловом белих пацова *Wistar* соја, према официјелној процедури у одговарајућој биохемијској лабораторији (Jovanović, 2012).

3.2.5. Минералозна испитивања биоматеријала

Структурна карактеризација минералног матрикса зуба вршена је методом инфрацрвене спектrophотометрије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), методом рентгенске дифракционе анализе (XRD) и скенирајућом електронском микроскопијом са електронском дисперзионом спектрометријом (SEM-EDS).

Стеро-микроскопска карактеризација биоматеријала

Узорци денталног ткива који су били изложени дејству различитих земљишних и водених медијума, карактерисани су стерео микроскопом (LEICA MZ 16 A) у циљу добијања информација о морфолошким променама на узорцима денталног

ткива који су били одложени у медијумима. Стерео-микроскопске слике су урађене на увећањима до 20 пута.

FTIR карактеризација биоматеријала

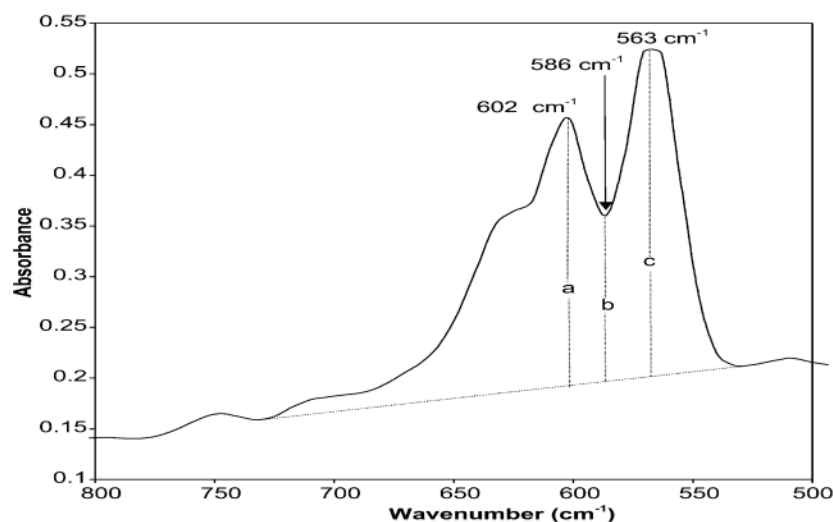
За снимање FTIR спектра референтних узорака земљишта, референтних и третираних узорака минералног коштаног ткива примењена је метода пресовања наведених узорака са претопљеним KBr-ом у KBr – пастилу. За прављење пастила одмерено је на аналитичкој ваги 1,5 mg узорка и 150 mg KBr, извршена је хомогенизација смеше у специјалној капсули у вибрационом млину. Смеша је испресована у специјалном калупу хидрауличном пресом (200 МПа) до формирања пастиле (пречник ~13 mm, дебљина ~0,3 mm). Припремљене пастиле су одлагане у папирним кесама и чуване у ексикатору, ради спречавања апсорпције влаге и угљен-диоксида. FTIR анализа је рађена на апарату FTIR BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canada), са DTGS/KBr (deuterated triglycine sulfate/KBr) детектором, у области таласних бројева од 4000-400 cm^{-1} и при резолуцији 2 cm^{-1} , са референтном пастилом припремљеном од чистог KBr-а (150 mg, Merck) на собној температури ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и температури течног азота ($T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Снимљени FTIR спектри су компјутерски обрађивани софтвером ACD/Labs, ACD/UV-IR Manager & Processor, Version 10.0 за Microsoft Windows (Copyright © 1994–2007 Advanced Chemistry Development).

Израчунавање степена кристалности биоматеријала

На основу IR спектра узорака дентина који су били изложени дејству различитих врста земљишта, положаја и интензитета карактеристичних трака за CO_3^{2-} и PO_4^{3-} , израчунавање степена кристаличности (CI) извршено је према једначини 3.1. која се примењује за израчунавање кристаличности синтетичких наноматеријала и хидроксиапатита (Greene *et al.*, 2004).

$$\text{CI} = (A_{602} + A_{563}) / A_{586} \quad (3.1.)$$

Положај апсорпционох трака на основу чијих вредности апсорбанце је извршено рачунање CI вредности је на таласним бројевима: 602 cm^{-1} , 563 cm^{-1} и 586 cm^{-1} (Слика 3.1.2.) (Greene *et al.*, 2004).



Слика 3.1.2. IR спектар зависности апсорбанце од таласног броја за синтетички хидроксиапатит (Absorbance: апсорбанца, Wavenumber: таласни број, степен кристаличности добијен према формули $CI=(a+b)/c$) (Greene *et al.*, 2004)

XRD карактеризација биоматеријала

Минерално коштано ткиво узорака зуба (нетретирани референтни и узорци који су били одложени у медијуму II) је најпре спрашено, а затим подвргнуто квалитативној XRD анализи на апарату Philips APD 1700. Вредности 2θ су мерене у интервалу од 10° до 60° при брзини скенирања од $0,5^\circ/\text{min}$. Интерпретација добијених дифрактограма је вршена на основу поређења позиције и интензитета дифракционих пикова са фајловима познатих кристалних материјала у бази JCPDS, 2003 (International Centre for Diffraction Data).

SEM-EDS карактеризација биоматеријала

За праћење морфолошких и промена у елементарном саставу минералног коштаног ткива зуба које је било изложено дејству употребљених медијума коришћена је скенирајућа електронска микроскопија са електронском дисперзионом спектрометријом. Метода је примењена на апарату „FEI QUANTA 200“ уз коришћење енергије побуђивања до 32 KeV и увећања од 400 до 1000 пута.

3.2.6. Статистичка обрада резултата мерења

За статистичку обраду резултата анализе садржаја биометала примењен је Student-ов t-тест (Microsoft Office Excel). Сви резултати мерења приказани су као средња вредност $\pm$ SD. Статистички су значајни резултати приказани као $p < 0,01$; $p < 0,05$ и $p < 0,1$.

3.3. МОДЕЛ СИСТЕМИ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – БИЉНА ВРСТА *CANNABIS SATIVA*

Младе биљке врсте *Cannabis sativa* које су од стране полиције заплењене као засад илегално посађен и гајен под контролисаним условима (тачно одрђени ниво температуре, влажности ваздуха и интензитета светла) у затвореном и строго контролисаном простору, на различитим локацијама у Републици Србији, представљају биоматеријал који је био предмет испитивања. Предметне биљке су изабране методом случајног узорка у фази раста. Све врсте хумусног земљишта у којима су биљке биле засађене, такође су узорковане за потребе анализе из зоне око кореновог система у дубини 5-10 cm.

3.3.1. Идентификација биљног материјала

Идентификација биљног материјала као *Cannabis sativa* је урађена макроскопски и микроскопски на микроскопу "Leica MZ 16" према упутствима датим од стране UNODC (2009). Специмен биљне врсте *Cannabis sativa* је у депозиту колекције хербаријума Природно-математичког факултета у Нишу под идентификацијомим бројем RSN0113.

3.3.2. Одређивање садржаја биометала

Миграција јона биометала у модел систему земљиште – биоматеријал биљне врсте *Cannabis sativa* испитивана је мерењем садржаја истих техником AAS. Одрђивање биометала (Cu, Zn, Mn, Fe, Ca и Mg) је урађено помоћу атомског апсорпционог спектрофотометра марке Perkin-Elmer Model 5000 са шупљом катодом. Сигнали су мерени уз корекције позадине (деутеријумска лампа) у оптималној висини пламена (A-Ac) (Razic *et al.*, 2006).

Одређивање Cr извршено је помоћу атомског апсорпционог спектрофотометра марке Perkin-Elmer Model 5000 са графитном пећи HGA 400 Automatic Burner Control уз коришћење пиролитичких графитних цеви. Температурни програм сушења, пиролизе, атомизације и чишћења је на температурама: 110, 1650, 2500 и 2650 °C (Razic *et al.*, 2006).

Биљке су најпре подељене на делове: корен, стабло и лист. Делови корена су очишћени од земљишта, испрани дејонизованом водом и осушени. Сви делови биљака су пре одређивања садржаја биометала подвргнути микроталасној дигестији под високим притиском на апарату CEM MDS-2000 уз раставарање помоћу HNO_3 , концентрације $c=6 \text{ mol/L}$ и H_2O_2 . Слична процедура примењена је на земљиште из области око кореновог система, чија је маса од 0,2 g подвргнута дигестији уз помоћ HNO_3 , концентрације $c=6 \text{ mol/L}$. Након дигестије, смеше које су садржале биљни материјал и земљиште су хлађене и филтриране кроз Milipore 0,45 μm филтер и растваране дејонизованом водом. Истовремено је припремана и слепа проба. Квантификација је извршена екстерном калибрацијом. Тачност методе је проверена анализом стандардних референтних материјала NIST SRM 1547 и NIST SRM 2711 уз добијање прихватљивих вредности за recovery (90,06 – 115,35%).

3.3.3. Одређивање садржаја канабиноида

За анализу садржаја канабиноида изабрани су листови младих биљака врсте *Cannabis sativa*, који су осушени, самлевени и спрашени. По 20 mg сваког узорка листа је растворено у 5 mL метанола, подвргнуто мешању у ултразвучном купатилу током 30 min, а затим је садржај процеђен и филтрат упарен до сува. Суви остатак је растворен у 2 mL метанола. 1 μL оваквог раствора сваког узорка је ињектиран у GC-FID.

Одређивање канабиноида је извршено применом Agilent GC система, модел 7890A, са пламено јонизујућим детектором. Услови рада апарата су: колона HP-5 (30 m $\times$ 320 μm $\times$ 0,25 μm), температура ињектора: 250 $^\circ\text{C}$, „splitless“ режим, температурни програм: иницијална температура 150 $^\circ\text{C}$ за 0 min, грејање 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$ до 300 $^\circ\text{C}$ и задржавање 5 min, проток азота: 46 mL/min. Садржај канабиноида у лишћу биљака cannabis је одређен екстерном калибрацијом.

3.3.4. Упоредивање садржаја канабиноида у различитим биоматеријалима биљне врсте *Cannabis sativa*

За потребе упоређивања садржаја канабиноида, нарочито садржаја психоактивне супстанце тетрахидроканабинола у различитим узорцима биоматеријала биљне врсте *Cannabis sativa* којима се разликује старост, употребљена је семиквантитативна метода танксолојне хроматографије (TLC) (НКТЦ МУП, 2013).

Осушен, самлевен и спрашен биљни материјал масе 33,3 mg је растворен у 5 mL метанола, подвргнут мешању помоћу ултразвучног купатила током 30 min, а затим је садржај процеђен. Филтрат је затим жарен на 150 °C, 12 min, како би се постигла потпуна декарбоксилација канабиноидних киселина и упаравање екстракта. Екстракти су растворени у 2 mL метанола и добијени нанешен на плочице за танкослојну хроматографију. Коришћене су алуминијумске плочице са силикагелом са индикатором флуоресценције UV254. На плочицу су поред анализираног раствора канабиоида запремине 1 μ L нанети и по 1 μ L раствора: Δ^9 -THC (тетрахидроканабинол), CBN (канабинол) и CBD (канабидиол) у метанолу концентрације 0,05 mg/mL и 1 μ L чистог метанола. Мобилна фаза је садржала n-хексан : диетилетар у односу 4 : 1. Визуелизација је извршена растваром Azoic Diazo Component у 0,1M раствору натријум-хидроксида.

3.3.5. Одређивање корелације између садржаја метала и садржаја канабиоида.

Статистичка обрада резултата

Статистичка обрада резултата анализе садржаја биометала у земљишту и биоматеријалу као и садржаја канабиоида је извршена анализом главних компонентата (PCA), употребом пакета софтвера SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) и Minitab 13.20 (Minitab Inc., State College, PA).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Табела 4.1.1. Садржај ОМ, рН и садржај метала у испитиваним земљишним медијумима

	Градско земљиште [mg/g]	Земљиште богато глином [mg/g]	Земљиште богато кречњаком [mg/g]
<i>Органски</i>			
<i>C</i>	12,71	59,58	21,45
<i>Ca</i>	48,23	0,21	88,44
<i>Mg</i>	58,00	0,54	8,84
<i>Cu</i>	0,03	0,04	0,15
<i>Fe</i>	0,02	0,26	24,98
<i>Zn</i>	0,62	0,03	0,38
<i>Pb</i>	0,004	0,007	н.д.*
<i>pH</i>	7,23	4,55	7,06

*није детектовано

У табели 4.1.2. приказани су резултати одређивања рН вредности и садржаја метала у испитиваним воденим медијумима: комерцијална вода „aqua viva“ и водени медијум модела кишнице.

Табела 4.1.2. Вредност рН и садржај метала у испитиваним воденим медијумима

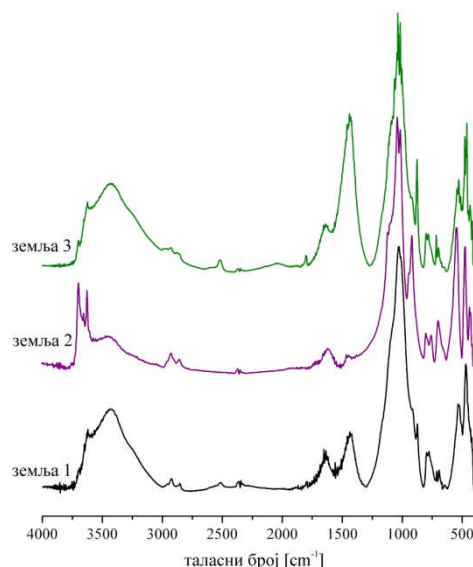
	Комерцијална вода „aqua viva“ [mg/L]	Водени медијум модела кишнице [mg/L]
<i>Ca</i>	120,00	1,20
<i>Mg</i>	45,20	0,43
<i>Cu</i>	<0,1	н.д.*
<i>Fe</i>	<0,05	н.д.*
<i>Zn</i>	<0,1	н.д.*
<i>Pb</i>	н.д.*	н.д.*
<i>pH</i>	7.22	6.13

*није детектовано

Резултати показују да је глинено земљиште најкиселије (рН=4,55) и да садржи највећи проценат органске материје. Сходно томе се за овај медијум очекује да ће најинтензивније фиксирати метале из минералног ткива. Ниска рН вредност, међутим може снизити катјонски измењивачки капацитет и повисити анјонски. Кречњачко земљиште, садржи највише калцијума, обзиром на главни конституент калцијум-карбонат, и око сто пута више гвожђа него други типови земљишта. Урбано градско земљиште садржи магнезијум и цинк више у односу на остале типове земљишта, па се

код овог земљишног медијума очекује врло интензивна размена јона ових метала обзиром на њихову добру покретљивост у земљишним растворима. У свим испитиваним типовима земљишта, бакра је било на нивоу средњег садржаја овог метала у земљишту (Sparks, 2003). Детектоване количине олова су у скалду са подацима из литературе (Kabata-Pendias & Mukherje, 2007). Садржај већине метала у воденим медијумима је врло низак или чак испод границе детекције инструмента. Ова чињеница наводи на закључак да ће се у случају оба водена медијума (комерцијална вода, „aqua viva“ и водени медијум модела кишнице) очекивати интензивна размена материје са минералним ткивом зуба у циљу успостављања равнотеже, при чему се интензивнија размена десила код воденог медијума модела кишнице за који је измерена рН вредност нешто испод 7.

Карактеризација земљишних медијума је извршена и употребом инфрацрвене спектроскопије. Инфрацрвени спектри земљишних медијума у кјојима је било одложено минерално ткиво узорак зуба приказани су на слици 4.1.2.



Слика 4.1.2. FTIR (зависност апсорбације од таласног броја) земљишних медијума: земља 1 (урбано градско земљиште), земља 2 (земљиште богато глином), земља 3 (земљиште богато кречњаком)

На инфрацрвеним спектрима је утврђено следеће:

- за градско земљиште: Si – O вибрација лискуна на 539 cm^{-1} , Si – O вибрација кварца на 466 cm^{-1} и 792 cm^{-1} , вибрације CO_3^{2-} на 693 cm^{-1} , 875 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1798 cm^{-1} и 2515 cm^{-1} , вибрације смектита и каолинита на 1030 cm^{-1} , вибрације

органске материје на 2870 cm^{-1} и 2925 cm^{-1} и вибрације које потичу од ОН групе на 3600 cm^{-1} – 3700 cm^{-1} ,

- за земљиште богато глином: Si – О вибрација лискуна на 539 cm^{-1} , Si – О вибрација фелдспата на 431 cm^{-1} и 748 cm^{-1} , Si – О вибрација кварца на 466 cm^{-1} и 792 cm^{-1} , вибрације смектита или каолинита на 1030 cm^{-1} , вибрације органске материје на 2870 cm^{-1} и 2925 cm^{-1} и вибрације које потичу од ОН групе на 3600 cm^{-1} – 3700 cm^{-1} ,
- за земљиште богато кречњаком: Si – О вибрација лискуна на 539 cm^{-1} , Si – О вибрација кварца на 466 cm^{-1} и 792 cm^{-1} , вибрације CO_3^{2-} на 693 cm^{-1} , 875 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1798 cm^{-1} и 2515 cm^{-1} , вибрације смектита и каолинита на 1030 cm^{-1} , вибрације органске материје на 2870 cm^{-1} и 2925 cm^{-1} и вибрације које потичу од ОН групе на 3600 cm^{-1} – 3700 cm^{-1} .

На основу уочених апсорпционих максимума закључује се да се фелдспат налази само у земљишту богатом глином, као и да ово земљиште не садржи карбонате. На основу више трака у области вибрација ОН групе, закључује се да ова врста земљишта садржи само глину каолинит, као и да има најинтензивније траке за вибрације органске материје, што упућује на закључак да ово земљиште садржи највише органске материје. Еквивалентни резултати за садржај органске материје добијени су мерењем садржаја органског угљеника у анализираном земљишту (Табела 4.1.1.). Најинтензивније траке вибрација карбонатног јона уочавају се код земљишта богатог кречњаком, при чему се траке вибрација органске материје код овог земљишта најслабије. Градско земљиште има мањи садржај карбоната, али више органске материје у односу на земљиште богато кречњаком. На основу облика траке вибрација ОН групе за градско земљиште и земљиште богато кречњаком, утврђује се да садрже смектит и мало каолинита.

4.1.2. Структурна карактеризација биоматеријала зуба

Биометријал минералног ткива зуба посматран је под стериомикроскопом у циљу прегледа морфологије површине истог. Прегледом нетретираног узорка зуба утврђено је да исти има хомогену структуру и да на њему нема трагова нагризајућег дејства, нити депозита (Слика 4.1.3.).



Слика 4.1.3. Нетретирани узорак дентина

Резултати одређивања садржаја метала у нетретираном узорку зуба приказани су у табелама 4.1.9. и 4.1.10. као „контрола“. Висок садржај калцијума је очекиван обзиром на структуру минералног ткива зуба као хидроксиапатита. Утврђено присуство биометала Cu, Fe, Zn и токсичног Pb објашњава се могућом адсорпцијом ових елемената на површину дентина. Од свих испитиваних биометала садржај Mg је највећи, што је узроковано малим полупречником и добром мобилношћу његовог јона. Слични резултати налазе се у литератури (Amr & Helal, 2010). Садржај осталих биометала Cu, Fe, Zn и токсичног Pb налазе се у распону вредности које су забележене у радовима других аутора (Amr & Helal, 2010).

На FTIR спектрима контролног узорака дентина (нетретирани узорак зуба) (Слика 4.1.5. - контрола) уочавају се спектралне траке карактеристичне за хидроксиапатит: дублет средње јаког интензитета на 562 и 603 cm^{-1} што представља валенциону вибрацију ν_4 . Наведене апсорпционе траке представљају карактеристичне апсорпционе траке калцијум фосфата. Уочава се широка трака на $\sim 1100\text{--}940\text{ cm}^{-1}$ што представља валенциону ν (P-OH) вибрацију и то ν_1 и ν_3 . На вредностима таласних бројева од ~ 3600 до $\sim 2500\text{ cm}^{-1}$ присутна је валенциона $\nu(\text{OH})$ вибрација, док се амидне траке колагена зуба јављају на 1660 , $1540\text{--}1550$ и 1240 cm^{-1} . Деформационе вибрације CH_3 групе се могу видети на око 1415 cm^{-1} . Трака на овом таласном броју врло често представља суперпозицију са апсорпционом траком карбоната. Трака на $\sim 875\text{ cm}^{-1}$ потиче само од валенционе вибрације која припада карбонатном јону. C-H вибрације алифатичних група се виде у делу од $2970\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$. Амидне траке колагена као органске материје детектују се: на $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ амидна трака I која потиче од валенционе вибрације карбонилне групе, на $\sim 1550\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$ амидна трака II која потиче од деформационе вибрације N-H купловане делимично са валенционом C-N вибрацијом, на $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ амидна трака III која потиче од валенционе C-N вибрације која се

куплује делимично а деформационом N-H. Уочене траке на спектрима нетретираног узорка су у сагласности са истим наведеним у литератури (Abdel-Maskoud *et al.*, 2009; Antunes, 2006; Darchuk, 2012; Kalicanin, 2006; Trueman *et al.*, 2004). Приказ спектралних трака хидроксиапатита дат је у табели 4.1.3.

Табела 4.1.3. Спектралне траке хидроксиапатита

Група у апатиту	Таласни број групе [cm ⁻¹]	Врста вибрације
PO ₄ ³⁻	~ 460	v2
	~ 562, 603	v4
	~ 1040	v1
	~ 1120	v3
CO ₃ ²⁻	~ 875	v
	~ 1418	v
ОН ⁻	~ 3650-2500	v
Амид III	~ 1240	v (C–N)
–CH ₃	~ 1418	δ (CH ₃)
Амид II	~ 1550-1540	δ (N–H)
Амид I	~ 1600	v (C=O)
–R	~ 2850-2970	v (C–H)

Минеролошко испитивање контролног узорка дентина применом рентгенске дифракције показује да се најинтензивнији пик на дифрактограму налази на вредности 2θ 31,8 и праћен је са још три интензивна пика на вредностима 2θ: 32,2; 32,9; 34,1 респективно (Слика 4.1.12.а). Поређењем позиција и интензитета пикова дифрактограма контролног узорка денталног ткива у односу на пикове дифрактограма библиотеке познатих кристалних материјала, детектује се једино кристал хидрокси апатит. У поређењу са геолошким апатитом, биолошки апатит је слабо кристалан, што се види у на дифрактограму према изостајању пикова на вредностима 2θ већим од 50° (Bergslien *et al.*, 2008).

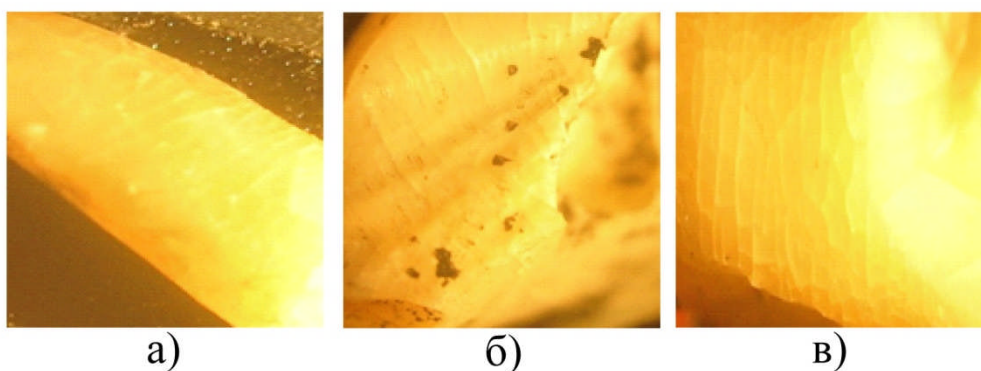
Даља минеролошка карактеризација биоматеријала дентина контролног узорка зуба, применом скенирајуће електронске микроскопије, показује на добијеној микрографској слици стање површине зуба (Слика 4.1.13.а). Утврђено је да се на површини дентина зуба не детектују промене у морфологији, као ни била какава нагрizaјућа дејства оралних течности. Локалне промене елементарног састава нису примећене ни на EDS спектру нетретираног узорка дентина, на коме се уочава елементарни састав који одговара хидроксиапатиту (Слика 4.1.16.а), при чему су

вредности масених процената елемената измењене у односу на теоријске (Miller *et al.*, 1993). Теоријска вредност стехиометријског односа Ca/P у хидроксиапатиту дентина износи 2,06. У узорку нетретираног зуба овај однос измењен у односу на теоријску вредност и износи 1,93 (Табеле 4.1.6. и 4.1.7.), што може да указује на то да ће овај дентин потенцијално бити лако подложен поступцима измене свог састава у присуству агенаса различитих медијума.

4.1.3. Праћење интеракције медијуми - биоматеријал зуба

Праћење интеракције медијуми - биоматеријал зуба применом стерео микроскопије

Стерео-микроскопске слике површина узорака зуба који су били изложени дејству земљишних медијума у периоду од шест месеци: зуб који је био изложен дејству градског земљишта (Слика 4.1.4.а), зуб који је био изложен дејству земљишта богатог садржајем глине (Слика.4.1.4.б) и зуб који је био изложен дејству земљишта богатог кречњаком (Слика.4.1.4.в) приказане су на слици 4.1.4.

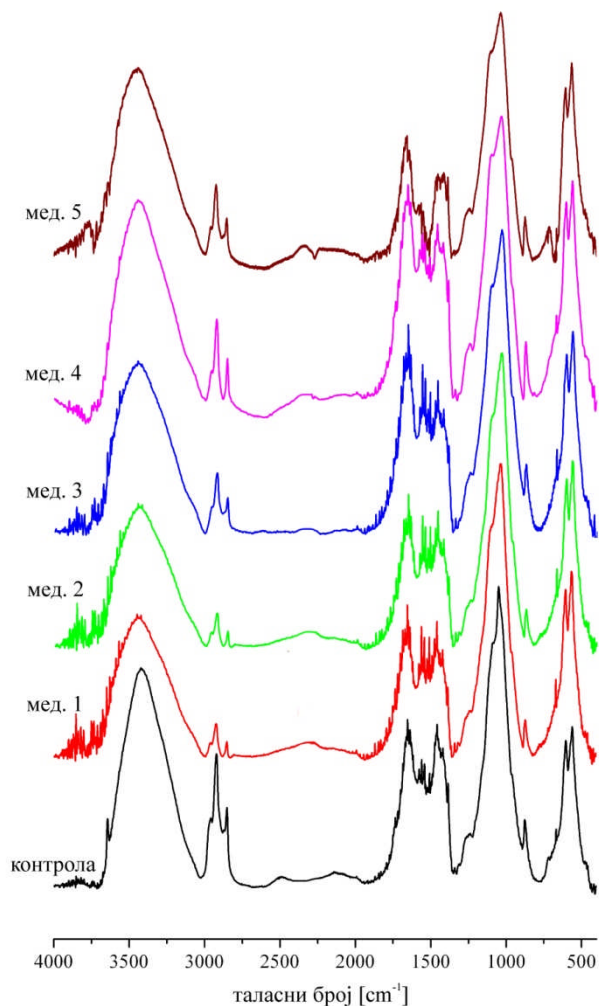


Слика 4.1.4. Стерео-микроскопске слике зуба

На сликама денталног ткива видљиве су промене у структури површине. На основу приказаних евидентираних промена на површини зуба у виду пукотина различитих величина и облика, утврђено је нагризајуће дејство сва три земљишна медијума након шестомесечног периода интеракције.

Праћење интеракције медијуми – биоматеријал зуба применом FTIR анализе

Минералошка испитивања тромесечне интеракције медијума и биоматеријала зуба применом FT-IR спектроскопије приказана су на FT-IR спектрима (Слика 4.1.5).



Слика 4.1. 5. FTIR спектри (зависност трансмитанце од таласног броја) контролног и узорака зуба након тромесечне изложености земљишним и течним медијумима: контрола (нетретирани узорак зуба), мед. 1 (узорак зуба који је био одложен у градском земљишту), мед. 2 (узорак зуба који је био одложен у глиненом земљишту), мед. 3 (узорак зуба који је био одложен у кречњачком земљишту), мед. 4 (узорак зуба који је био одложен у комерцијалној води „aqua viva“), мед. 5 (узорак зуба који је био одложен у воденом медијуму модела кишнице)

Карактеристичне траке хидроксиапатита описане су у поглављу 4.1.2. Наведене траке су присутне у контролном узорку дентина зуба и у свим узорцима који су били изложени дејству различитих медијума.

Узорци минералног коштаног ткива који су више година (до 15 година) били изложени дејству земљишта, испитивани су и утврђена је редукција органске материје и повећање кристалности услед хидролизе колагена (Trueman *et al.*, 2004). Дентин зуба се на сличан начин понаша као и коштано ткиво (Trueman *et al.*, 2004). Нема литературних података о томе како се минерално ткиво дентина понаша под дејством спољашњих медијума (земљишних и водених).

Контакт денталног ткива зуба са различитим медијумима изазвао је морфолошке промене површине дентина, као и измене трака које су наведене и карактеристичне за минерални али и садржај органске материје дентина зуба. На инфрацрвеним спектрима контролног узорка зуба и узорака који су били изложени различитим врстама медијума (Слика 4.1.5) уочава се следеће:

- Нема значајних измена у интензитету О-Н вибрација које потичу од асосованих хидроксилних група водоничном везом,
- С-Н вибрације алифатичних група органске материје имају смањен интензитет у свим узорцима зуба који су били изложени дејству медијума у односу на контролни узорак зуба. Нарочито смањење се примећује код узорака зуба који су били изложени дејству земљишних медијума услед потенцијалних интеракција између протеинског дела, нарушене органске материје зуба и земљишних и водених медијума.
- Однос интензитета амидне траке I и траке деформационе вибрације метил групе је измењен у односу на контролни узорак, тако да је амидна трака интензивнија од траке деформационих вибрација метил група за све узорке зуба изложене дејству коришћених медијума.
- Амидна трака II је интензивнија код свих узорака који су били изложени дејству медијума.
- Амидна трака III је смањеног интензитета, првенствено у узорку денталног ткива које је било изложено земљишту богатом глином, а онда и у узорцима зуба који су били изложени дејству осталих земљишних и водених медијума респективно, у односу на контролни узорак.
- Интензитет траке карбоната на $\sim 875\text{ cm}^{-1}$ је већи код зуба одложеног у медијуму комерцијалне воде „aqua viva“ у односу на контролни узорак. У зубу који је био изложен медијуму који представља модел кишнице нема значајних промена интензитета овог пика, док се значајно смањење интензитета ове траке

примећује код узорака зуба који су били изложени дејству свих земљишних медијума, нарочито у случају узорка зуба који је био изложен дејству земљишта богатог кречњачком и урбаног градског земљишта.

- Нема значајних промена у интензитету фосфатних трака у посматраним узорцима који су били изложени дејству различитих медијума у односу на контролни узорак.

За хидролизу колагена је неопходно присуство воде, па се у свим узорцима који су били изложени дејству медијума у дужем временском периоду може очекивати изванредан степен деградације колагена изазван хидролизом услед присуства воде. Колаген се састоји од три протеинска ланца чврсто везана водоничним везама у којима су пак заступљене углавном аминокиселине глицин, пролин и хидроксипролин. У контролном узорку деформационе N-H вибрације и валенционе вибрације карбонилне групе су мање интензивне услед водоничних веза између колагенских ланаца на N-H и C=O местима пептидне везе у оквиру секундарне структуре колагена. Након хидролизе колагена услед дејства воде у свим медијумима, долази до повећања интензитета трака N-H и C=O вибрација, услед раскидања водоничних веза које су одговорне за секундарну структуру колагена. Интензивнија је валенциона C-N вибрација у контролном узорку са везаним колагенским ланцима, него у узорцима који су били изложени дејству медијума, објашњава се нестајањем секундарне структуре протеина колагена. Слични резултати у испитивању колагена налазе се у литератури (Abdel-Maskoud *et al.*, 2009). У зубном ткиву које је било изложено дејству земљишних медијума интензитет ове вибрације је смањен у односу на исту вибрацију у зубном ткиву које је било у воденим медијумима, а нарочито смањење се запажа код ткива зуба које је било одложено у земљишту богатом глинеом, што се може протумачити способношћу глинених конституената, услед негативног наелектрисања, да утичу ефикасно на разарање секундарне структуре колагена.

Минерални садржај денталног ткива такође је претрпео извесне промене; интензитет карбонатне траке је већи код узорка који је био изложен дејству воденог медијума “aqua viva” обзиром на то да ова вода садржи растворни хидроген-карбонатни јон, за разлику од воденог медијума модела кишнице, који је не садржи карбонате. Узорак зуба који је био изложен дејству земљишта богатог садржајем кречњака показује смањење интензитета карбонатне траке на свом инфрацрвеном спектру, што се објашњава тиме да је карбонатни јон из земљишта у облику нерастворних карбоната, те је стога тешко доступан за размену са денталним ткивом,

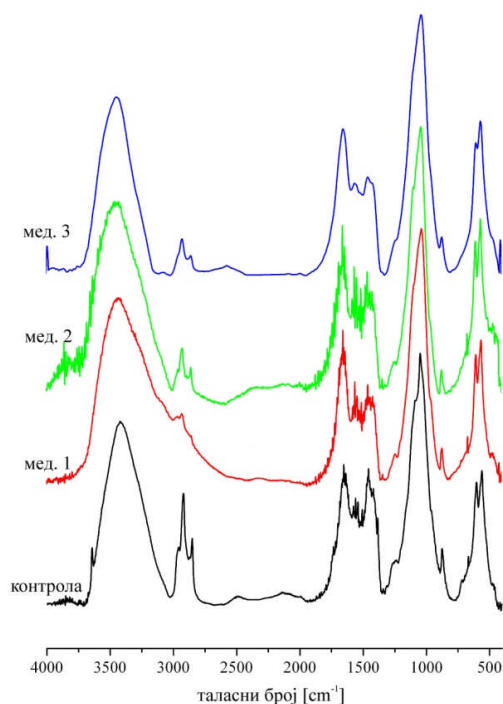
али је могуће излуживање карбонатног јона из зуба и његово таложење у земљишту. Према смањеним интензитетима карбонанних трака код узорак зуба који су били изложени дејству остала два земљишна медијума, такође се примећује излуживање карбоната. Изражен садржај калцијумовог јона у градском земљишту погодује излуживању карбоната из зуба у циљу формирања слабо растворног калцијум карбоната.

Дејство земљишних медијума на дентално ткива, нарочито се види на инфрацрвеном спектру узорак денталног ткива који су били изложени дејству ових медијума у периоду од шест месеци (Слика 4.1.6.). Уочава се следеће:

- Нема значајних измена у интензитету О-Н вибрација које потичу од асоцираних хидроксилних група водоничном везом код узорак дентина који су били одложени у земљишним медијумима у периоду од шест месеци у односу на узорке дентина који су били одложени у току тромесечног периода у земљишним медијумима.
- С-Н вибрације алифатичних група органске материје имају повећан интензитет у узорцима зуба који су били изложени у току шестомесечног периода дејству земљишта богатог глином и земљишта богатог кречњаком, у односу на интензитет ове траке за узорке који су били изложени дејству ових земљишних медијума у тромесечном периоду. Међутим и поред детектованог повећања, интензитет ових трака не достиже ниво који показује нетретирани узорак зуба. Узорци зуба који су били одложени у градском земљишту у периоду од три и од шест месеци, показују приближно исти интензитет С-Н вибрације алифатичних група органске материје.
- Однос интензитета амидне траке I и траке деформационе вибрације метил групе је измењен у односу на контролни узорак, као и у односу на узорке дентина који су били изложени дејству земљишних медијума у тромесечном периоду; тако да је амидна трака много интензивнија од траке деформационих вибрација метил група за све узорке зуба изложене дејству коришћених земљишних медијума у шестомесечном периоду.
- Интензитет амидне траке II у узорцима зуба који су стајали у градском земљишту је исти за оба посматрана временска интервала. У денталним ткивима зуба који су били одложени у периоду од шест месеци у земљишту богатом

глином и земљишту богатом кречњаком, дошло је до смањења интензитета ових трака.

- Интензитет амидне траке III показује смањење за узорке денталног ткива који су били одложени у шестомесечном периоду у свим употребљивим земљишним медијумима.
- Интензитет траке карбоната на $\sim 875\text{ cm}^{-1}$ је смањен код узорака зуба који су били изложени шестомесечном дејству земљишта богатог глином и земљишта богатог кречњаком у односу на узорке који су били одложени у овим медијумима у периоду од три месеца. Интензитет ове траке се повећава за узорке који су били изложени градском земљишту у различитим временским интервалима.
- Постоје промене у односу интензитета фосфатних трака на $\sim 603\text{ cm}^{-1}$ и $\sim 562\text{ cm}^{-1}$ за узорак дентина који је био изложени у шестомесечном периоду дејству земљишта богатог кречњаком. Детектоване су измене у облику пикова валенционе Р-ОН вибрације код свих узорака након шестомесечног стајања у земљишним медијумима.



Слика 4.1.6. FTIR спектри (зависност трансмитанце од таласног броја) контролног и узорака зуба након шестомесечне изложености земљишним медијумима: контрола (нетретирани узорак зуба), мед. 1 (узорак зуба који је био одложен у градском земљишту), мед. 2 (узорак зуба који је био одложен у глиненом земљишту), мед. 3 (узорак зуба који је био одложен у кречњачком земљишту)

Наведене промене настају из различитих разлога. Измене у интензитету C-H вибрације указују на то да је примарно, у току тромесечног дејства медијума, дошло до разлагања органске материје дентина која је евидентирана у виду колагена. Након шестомесечног стајања зуба у земљишним медијумима, долази до инвазивног дејства органске материје земљишта на дентин узорака зуба, који је претходно (након тромесечног стајања) осиромашен садржајем органске материје услед деградације колагена. Поменуто дејство се најмање види код зуба који је био изложен дејству градског земљишта, услед потенцијално мале расположиве количине органске материје у овом земљишту. У случају дентина узорака зуба који су били изложени дејству остала два земљишна медијума у периоду од шест месеци, наведено дејство је интензивније, обзиром на то да земљиште богато глином и земљиште богатом кречњаком имају висок садржај органске материје.

Интензивнија трака амид I даје информације о томе да се након шестомесечног дејства земљишних медијума наставља процес разградње секундарне структуре колагена услед раскидања водоничних веза између хеликса. Повећање интензитета ове траке након тромесечног стајања минералног ткива зуба у земљишним медијумима у односу на контролни (нетретирани) узорак, као даљи наставак оваквог тренда измене интензитета наведене траке услед повећања њене поларности, говори о континуираном процесу разградње колагена у задатим условима. У том смислу, интензивна трака амид I може бити индикатор дужег стајања дентина зуба у земљишним медијумима. Међутим, разлика у дејству земљишних медијума на интензитет ове траке, не може се уочити на основу спроведеног истраживања.

Након шестомесечног периода дејства земљишних медијума, уочава се снижење интензитета амид II траке на инфрацрвеном спектру свих узорака дентина настало као последица раскидања интрамолекулских водоничних веза и „ослобађања“ N-H везе, која слободним електронским паровима на азоту може учествовати у различитим интеракцијама са конституентима земљишта. На овај начин се смањује поларност ове везе и сходно томе се уочава опадање интензитета деформационе N-H вибрације. Интересантно је запажање да се након тромесечног дејства земљишних медијума, најпре среће повећање интензитета ове вибрације настало услед деградације секундарне структуре колагена. Након шестомесечног дејства земљишних медијума, долази до инвазивнијег деловања земљишних медијума. Дакле, на основу интензитета амид II траке, такође се закључује о периоду стајања денталног ткива у различитим земљишним медијумима.

Интензитет амидне траке III опада током стајања узорка дентина у периоду од три месеца. Овакав тренд се наставља и после шестомесечног периода дејства земљишних медијума на узорке дентина зуба. Промене су највише изражене код дентина који су били изложени дејству земљишта богатог глином и кречњаком. Евидентна је интеракција конституената земљишта са пептидним везама аминокиселина колагена, а након деградације истог. Смањење интензитета ове траке управо наступа услед реакција пептидних веза и смањења поларности C-N везе. Промена интензитета за све три амидне траке, врло директно указује на закључак да је на дентину узорка зуба дошло до дијагенезе, те да се степен дијагенезе разликује за различите периоде свог трајања, уз тенденцију повећања интензита трака са повећањем времена. Интензитет траке CO_3^{2-} јона има тренд опадања у свим узорцима који су били одложени у земљишним медијумима у периоду од три месеца, како је наведено, услед излуживања поменутог јона из минералног ткива дентина. Након шестомесечног периода одлагања, тенденција излуживања још увек се наставља за зубе који су били одложени у глиненом и земљишту богатом кречњаком, док се код градског земљишта, супротно, примећује повећање интензитета карбонатне траке. Земљиште богато глином не садржи карбонате, док земљиште богато кречњаком садржи карбонате у облику нерастворне форме калцијум карбоната. У оба случаја је било каква дифузија карбонатног јона у дентин зуба немогућа, те се сходно томе и дешава излуживање овог јона из зубног ткива. У узорку дентина који је био одложен у градском земљишту, након шест месеци, долази до промене тенденденције излуживања и карбонатни јон поново преципитира на дентину, највероватније услед успостављања равнотеже са јонима калцијума којима обилује овај земљишни медијум. Промене настале у изгледу валенционих вибрација фосфатне групе настале услед шестомесечног дејства земљишних медијума, указују да су се десиле измене у електронској густини и деформације структуре фосфатне групе. Промене у изгледу, облику и интензитету трака карактеристичних за валенционе вибрације фосфатне групе, указује на закључак да је на дентину узорка зуба дошло до дијагенезе. Степен промена насталих у дентину, који се препознаје према променама облика и интензитета трака фосфатног јона, указује на то да је временски период у коме су се промене дешавале био дужи од три месеца, тј. да је трајао најмање шест месеци. Овакве информације могу бити драгоцене у смислу форензичког закључивања о дужини контакта дентина зуба као форензичког материјала и земљишта као окружујућег медијума.

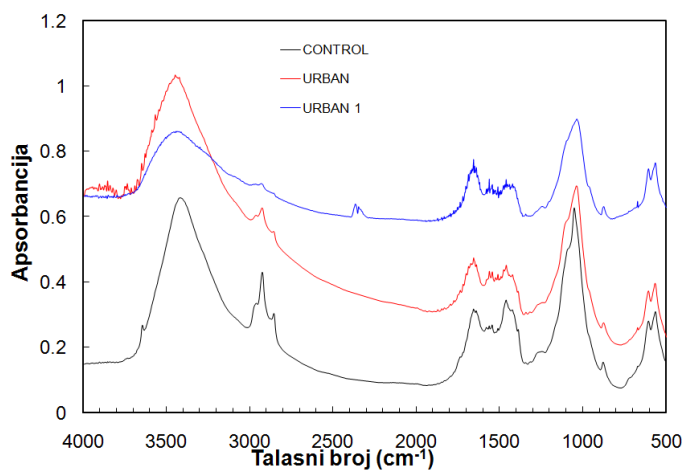
Табела 4.1.4. Поређење промена интензитета вибрација узорака дентина зуба који су били одложени у земљишним медијумима: ↓ снижавање интензитета траке, ↑ повећавање интензитета траке, ↕ промена интензитета траке (раст и опадање)

		Врста вибрације [cm ⁻¹]				
		ν (C-H)	Амидна I	Амидна II	Амидна III	ν (CO ₃ ²⁻) ν (PO ₄ ³⁻)
Контрола		2850-2970	1660	1550-1540	1240	875 603-562, 1100-940
Вре изложености	Три месеца	↓	↑	↑	↓	↓ /
	Шест месеци	↑	↑	↕	↓	↕ ↕

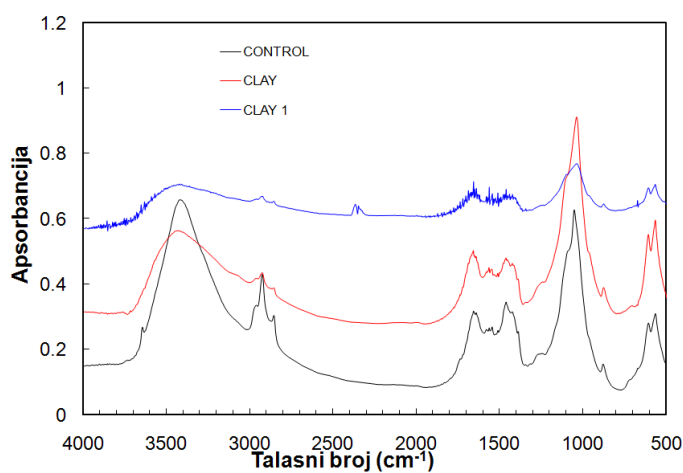
Поређење интензивних промена појединих вибрација карактеристичних за узорке дентина који су били изложени свим медијумима у периоду од три и шест месеци, у односу на контролни узорак дато је у табели 4.1.4. Уочава се да интензитет амидне траке I има тенденцију раста пропорционално дужини периода одлагања узорака дентина зуба у земљишту. Супротно, интензитет амидне траке III показује опадање код свих узорака дентина зуба пропорционално периоду одлагања истих у земљишту. Интензитет амидне траке II и карбонатне траке дентина свих узорака зуба показују раст и опадање, у току тромесечног периода одлагања у земљишту, док се за шестомесечни период одлагања оваква законитост не може утврдити. Интензитет валенционе C-H вибрације показује најпре снижавање у току тромесечног периода одложености у земљишним медијумима, док након шест месеци изложености дентина, интензитет ове траке расте. Интензитет фосфатних трака се не мења након тромесечног периода излагања дентина свим врстама земљишта. Након шест месеци, долази до промена у односу интензитета појединих фосфатних трака за све узорке дентина који су били изложени дејству различитих земљишних медијума, док се на неким фосфатним тракама уочава измена у облику трака.

Резултати одређивања степена кристаличности биоматеријала дентина зуба

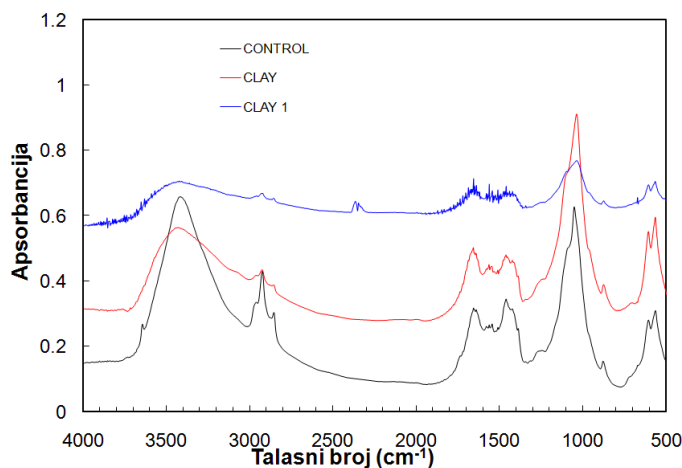
FTIR спектри нетретираног и биоматеријала који су у тромесечном и шестомесечном периоду били изложени дејству градског, глиненог и кречњачког земљишта приказани су на сликама: 4.1.7., 4.1.8. и 4.1.9.



Слика 4.1.7. FTIR спектар нетретираног (control) и биоматеријала дентина изложеног дејству градског земљишта у периоду од 3 (urban) и 6 месеци (urban 1).

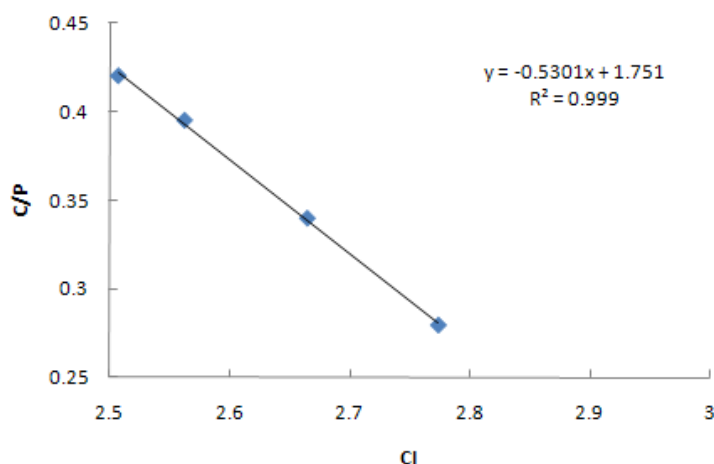


Слика 4.1.8. FTIR спектар нетретираног (control) и биоматеријала дентина изложеног дејству глиненог земљишта у периоду од 3 (clay) и 6 месеци (clay 1).



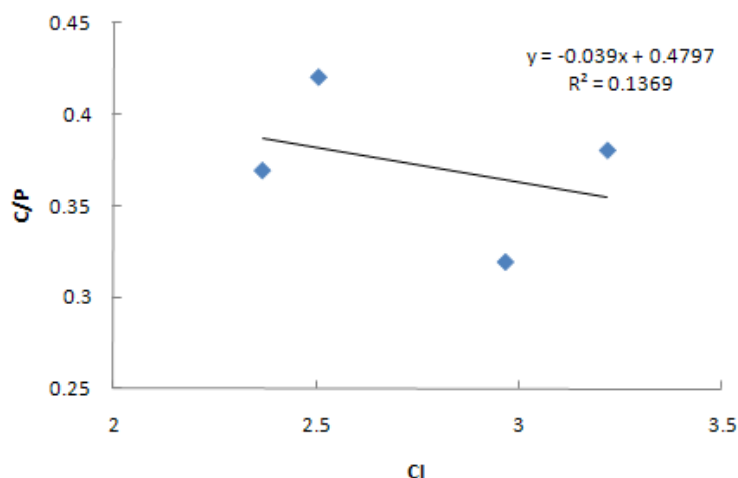
Слика 4.1.9. FTIR спектар нетретираног (control) и биоматеријала дентина изложеног дејству кречњачког земљишта у периоду од 3 (lime) и 6 месеци (lime 1).

На основу приказаних спектара, а према поступку описаном у поглављу 3.2.4. извршено је израчунавање степена кристаличности CI према једначини број 3.1. (Greene *et al.*, 2004). У циљу тумачења промена степена кристаличности узорак дентина који су били изложени дејству различитих медијума у тромесечном и шестомесечном периоду, успостављена је зависност односа C/P од степена кристаличности. Добијене зависности приказане су на сликама 4.1.10. и 4.1.11. У случају зависности којом је представљено тромесечно дејство земљишних медијума на дентин, добијена је корелација од $R^2=0,999$ (Слика 4.1.10), што указује на истоветну тенденцију промена односа C/P насталу услед униформних промена које се дешавају на дентину под дејством земљишних медијума у периоду од три месеца. Однос C/P опада од вредности 0,420 за контролни узорак дентина, преко 0,395 за узорак дентин који је био изложен дејству кречњачког земљишта, затим 0,340 за дентин из урбаног градског земљишта, до вредности 0,280 за узорак дентина који је био изложен глиненом земљишту. Промене поменутог односа су вероватно везане за физичко-хемијске процесе трансформације карбонатног дела минералног ткива дентина: растварање, хидролизу и др., у опсегу pH вредности од 4,55-7,23 анализираних земљишних медијума.



Слика 4.1.10. Зависност односа C/P од степена кристалности CI за нетретирани и узорке дентина изложене дејству земљишних медијума у периоду од три месеца

Након шестомесечне изложености зуба корозивном дејству земљишних медијума долази до изразитих промена у структури фосфатних група дентина, услед дејства присутних минералних врста, киселости односно базности средине у различитим типовима земљишта, те тенденција промене односа C/P више није униформна. Вредности поменутог односа опадају од 0,420 за контролни узорак зуба (дентина), преко 0,380 за узорак биоматеријала који је био изложен дејству глиненог земљишта, затим 0,369 за узорак изложен дејству кречњачког земљишта, до вредности 0,319 за узорак зуба (дентина) који је био изложен урбаном градском земљишту. Сходно томе да сус се промене дешавале под дејством различитих услова у појединим типовима земљишта, зависност C/P односа од степена кристаличности показује значајно мањи фактор корелације (Слика 4.1.11.).

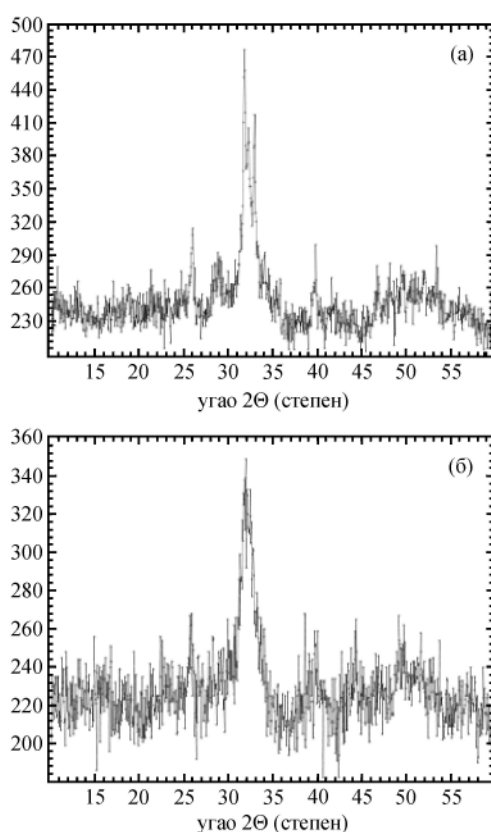


Слика 4.1.11. Зависност односа C/P од степена кристалности CI за нетретирани и узорке дентина изложене дејству земљишних медијума у периоду од три месеца

Утврђено смањење односа C/P апатита у дентину зуба, повећање степена кристаличности услед формирања већих кристала јесте знак дијагенезе дентина. Што је време дијагенезе дуже, интензивније опада однос C/P, фаворизовано је формирање већих и уређенијих кристала, па је степен кристаличности већи. Сличне промене на хидроксиапатиту форензичких узорака костију забележене су у литератури (Patonai *et al.*, 2013). Преко овог параметра могу се пратити и квантификовати на одређени начин промене, потенцијално форнезичког материјала, минералног ткива зуба изложеног корзивном дејству у природним условима.

Праћење интеракције медијуми – биоматеријал зуба применом XRD анализе

Резултати минералношког испитивања контролног и узорка дентина зуба који је био изложен дејству земљишног медијума богатог глиненим минералима, применом рентгенске дифракционе анализе приказани су на слици 4.1.12. у виду дифрактограма.



Слика 4.1.12. XRD дифрактограми а) нетретираног зуба и б) зуба који је био изложен земљишту богатом глином

Параметри добијени применом квалитативне XRD технике, дају могућност поређења кристалне структуре контролног узорака зуба и узорака који су били одложени у

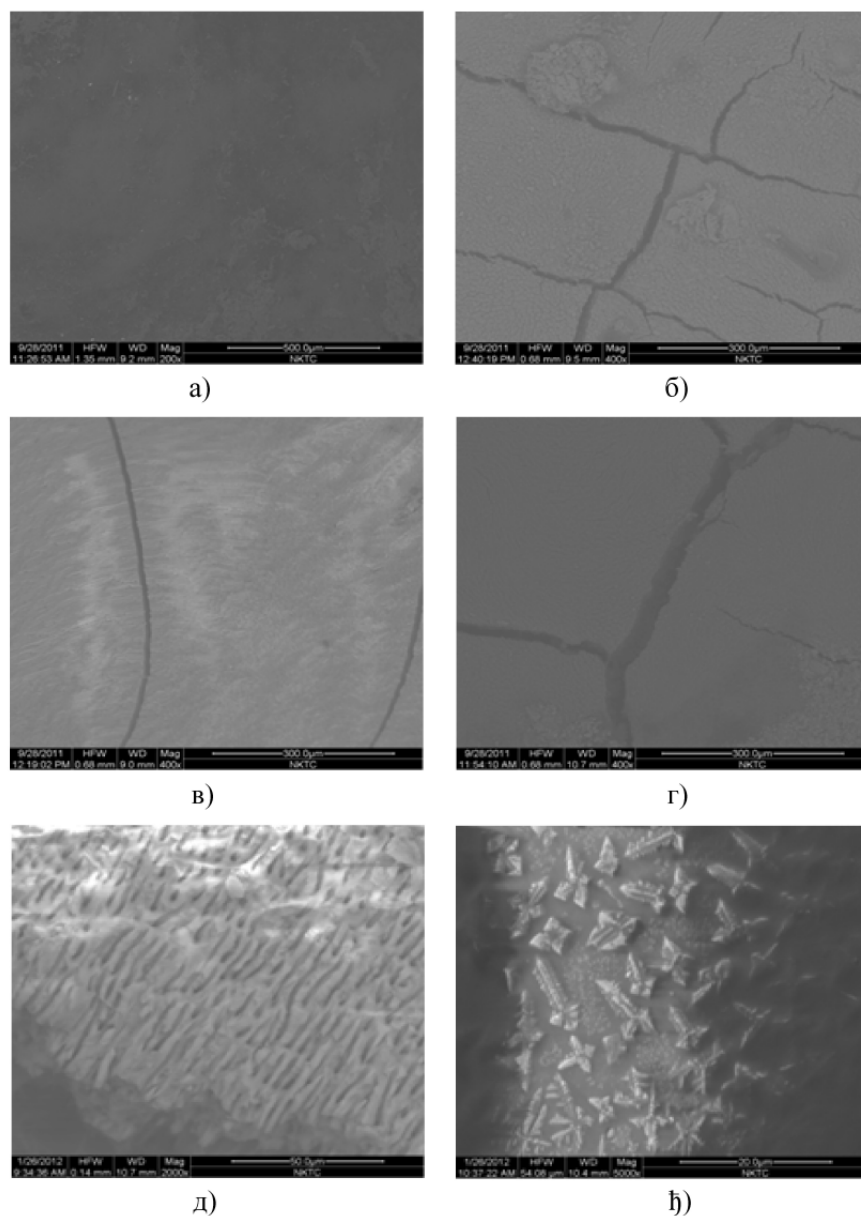
различитим медијумима. Очекивало би се да услед стајања коштаног ткива и смањења садржаја органске материје (што је доказано применом инфрацрвене спектроскопије), ниво кристалности хидроксиапатита расте, показујући већу величину кристала и тиме уже пикове на дифрактограму (Prieto-Castelló *et al.*, 2007). На свим посматраним узорцима најинтензивнији пик је примећен на отприлике 2θ 31,8 и праћен је са још три интензивна пика на 2θ око 32,2; 32,9 и 34,1. Поређењем позиција и интензитета пикова дифрактограма узорака денталног ткива који су били изложени дејству свих медијума, у односу на пикове дифрактограма библиотеке познатих кристалних материјала, закључује се да се у свим испитиваним узорцима детектује једино кристал хидрокси апатит. Разлика у изгледу дифрактограма у односу на контролни узорак је примећена за узорак денталног ткива који је био изложен дејству земљишног медијума који је богат садржајем глине (Слика 4.1.12.б). Ова разлика у дифрактограму се огледа у разлици у интензитету и ширини пикова карактеристичних за хидроксиапатит на вредностима 2θ од: 31,8; 32,2; 32,9; 34,1. Иако квантитативна XRD анализа није примењена на предмете узорке зуба, те није извршено рачунање просечне величине кристала, ипак се на основу снижења интензитета и повећања ширине пикова на дифрактограму узорка зуба који је био одложен у земљишном медијуму богатом глином, може закључити смањење кристалности хидроксиапатита зуба. Кристалност хидроксиапатита може бити умањена уласком карбонатних или хидроксилних јона у кристалну решетку апатита (Pasteris *et al.*, 2004). На основу информација које пружају FTIR спектри, у случају узорака зуба који су били изложени земљишним медијумима, десило се напротив, излуживање карбонатног јона, те се овакав разлог не би могао узети у обзир за тумачење смањене кристалности хидрокси апатита у денталном ткиву које је било изложено дејству земљишног медијума богатог глином. Присуство колагена у дентину зуба и потенцијално расејање електрона приликом примене XRD анализе на узорке зуба, даје занемарљиве ефекте у тумачењу кристалности апатита (Piga *et al.*, 2012).

Појава смањене кристалности хидроксиапатита у денталном материјалу одложеном у земљишту богатом глином, може се објаснити високим садржајем органске материје у овом земљишном медијуму и могућношћу да различити њени конституенти (фулвинске и хуминске киселине, њихове поларне функционалне групе и производи њиховог распадања...) продру у кристалну решетку апатита, постану конкурентни атомима кисеоника у апатиту, и вежу се за катјоне метала.

За узорке зуба који су били изложени дејству других медијума, није утврђена разлика у изгледу дифрактограма, што је у сагласности са тврдњом да дејство временских услова и дијагенеза не утиче битно на измену кристалне структуре апатита минералног коштаног ткива, док се видне промене региструју у измени концентрације елемената у траговима у узорцима коштаног ткива које подлеже дијагенези што је приказано у поглављу 4.1.4. Наведене тврдње проналазе се и у литератури (Bergslien *et al.*, 2008).

Праћење интеракције медијуми - биоматеријал зуба применом SEM-EDS анализе

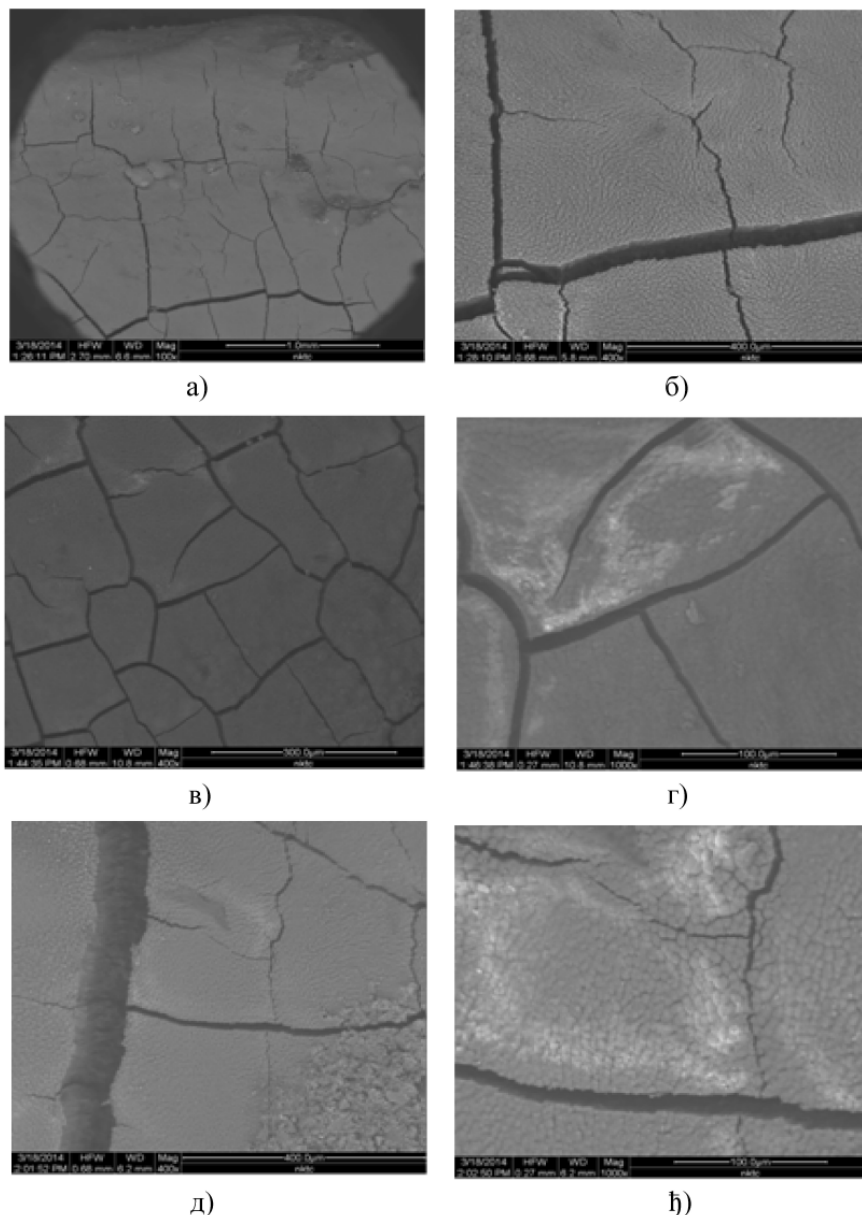
SEM микрографија нетретираног и узорка зуба који су били одложени у земљишним и воденим медијумима у периоду од три месеца приказана је на слици 4.1.13. Микрографија показује стање површине нетретираног узорка зуба и деградиционе морфолошке промене на дентину у узорцима зуба који су били изложени дејству различитих медијума. На сликама се може уочити интензивно



Слика 4.1.13. SEM микрографија за а) нетретирани зуб, тромесечни период излагања: б) зуб изложен градском земљишту, в) зуб изложен земљишту богатом глином г) зуб изложен земљишту богатом кречњаком, д) зуб изложен воденом медијуму “aqua viva”, ђ) зуб изложен воденом медијуму моделу кишнице

деловање земљишних медијума на површину дентина узорака зуба у виду пукотина различитих дијаметара које су карактеристичне за корозију овог биоматеријала. Највећи број пукотина је примећен на узорцима дентина који су били изложени дејству урбаног градског земљишта и земљишта богатог кречњачњаком (Слика 4.1.13. б и в), док су најшире пукотине примећене код земљишта које је богато садржајем глине (Слика 4.1.13.г). Под дејством воденог медијума „aqua viva“ структура дентина је претрпела ерозивне промене, што се види по присуству удубљења и испупчења различитих величина (Слика 4.1.13.д), док је на површини дентина, који је био изложен дејству воденог система модела кишнице, примећен кристални депозит (Слика 4.1.13.ђ). Уочене пукотине на површинама зуба потичу од интеракција зуба са околним медијумима и изазване су дејством органских киселина из земљишта и јона метала из земљишта и воде.

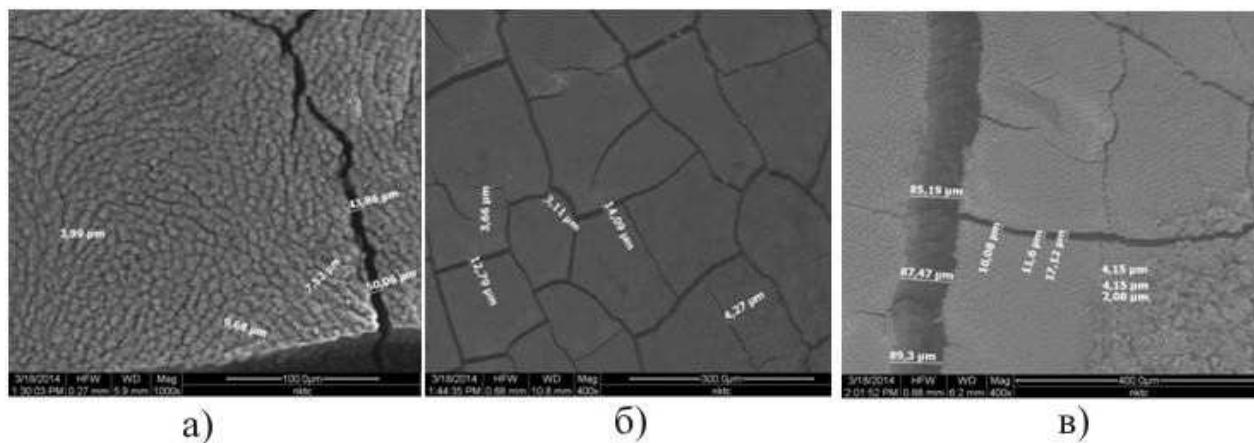
Дејство земљишних медијума на дентин узорака зуба који су били изложени дејству овим медијумима у периоду од шест месеци приказано је на слици 4.1.14.



Слика 4.1.14. SEM микрографија за а) и б) зуб изложен градском земљишту, в) и г) зуб изложен земљишту богатом глином д) и е) зуб изложен земљишту богатом кречњаком у периоду од шест месеци

Након шестомесечног деловања земљишних медијума на дентин узорак зуба, уочава се да је тенденција формирања великог броја пукотина различитог дијаметра интензивнија него у периоду од три месеца. На свим сликама се може уочити интензивна промена микрокристалне структуре дентина. Највећи број пукотина и најуочљивија промена микроструктуре дентина је примећена на узорцима који су били изложени дејству урбаног градског земљишта и земљишта богатог кречњаком (Слика 4.1.14.а, б, д и е). Дијаметар пукотина је у распону: од 0,85 μm до 50,06 μm на дентину

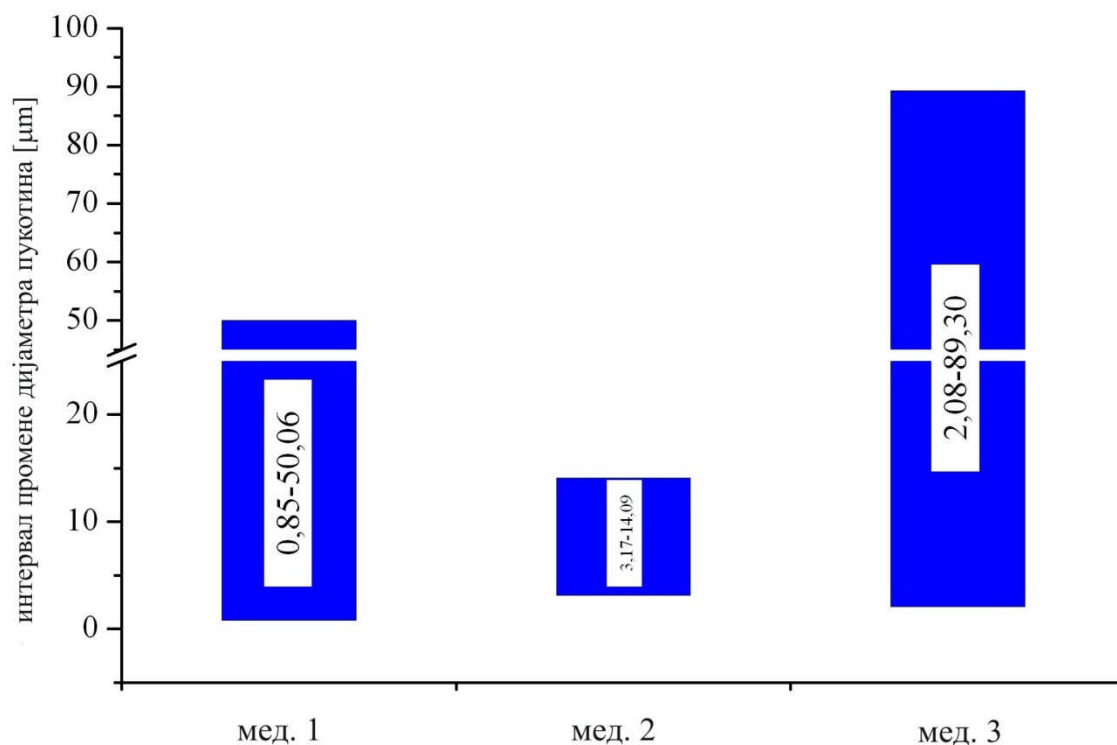
зуба који је био изложен дејству урбаног градског земљишта; од 3,17 μm до 14,09 μm на дентину који је био изложен дејству земљишта богатог садржајем глине и од 2,08 μm до 89,3 μm на дентину који је био изложен дејству земљишта које богато кречњаком (Слика 4.1.15.).



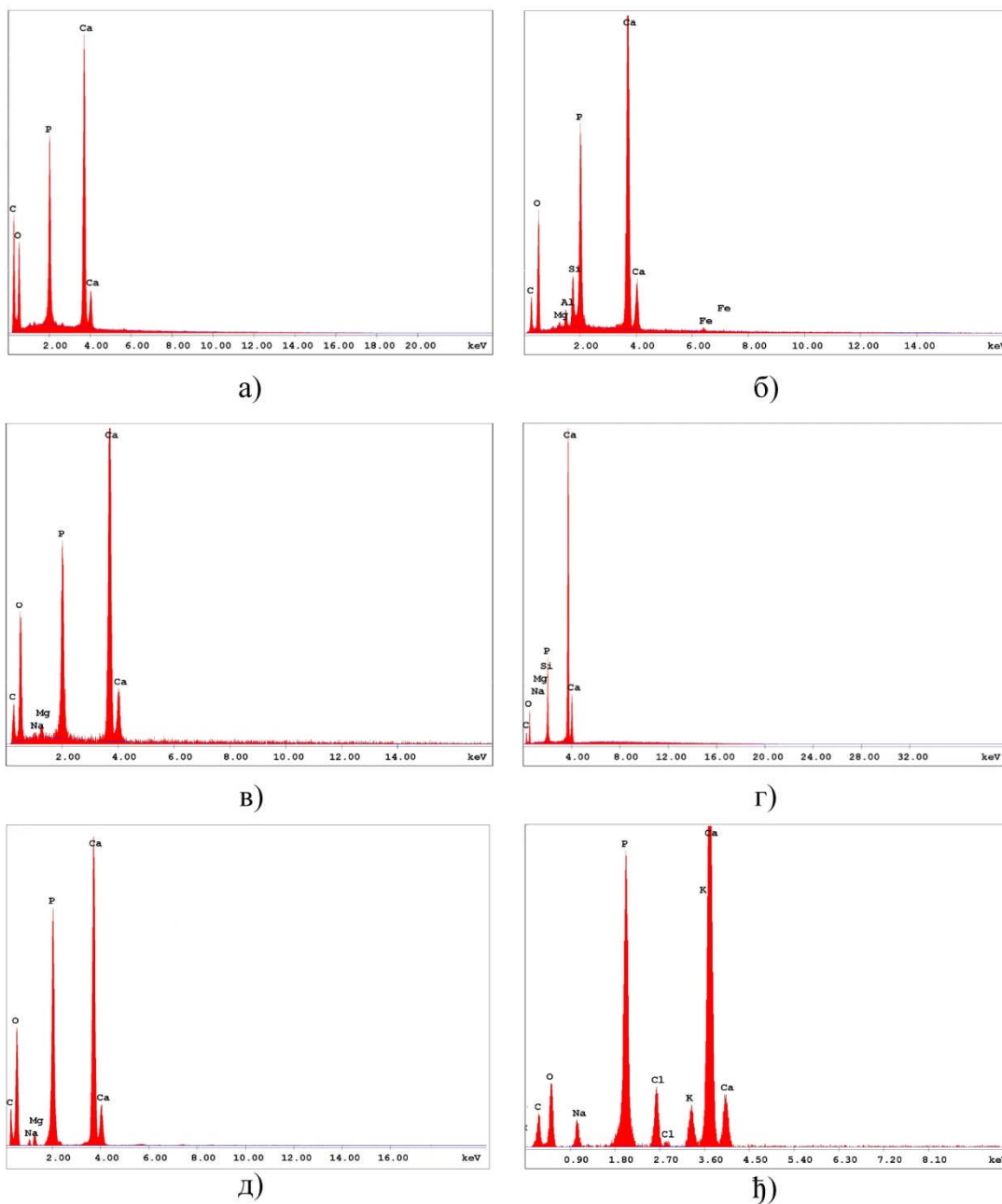
Слика 4.1.15. Дијаметар пукотина дентина узорка зуба који је изложен: а) урбаном градском земљишту, б) земљишту богатом глином, в) земљишту богатом кречњаком

Најшире пукотине настају на дентину зуба који је био изложен дејству земљишта богатог кречњаком, док се дентин који је био изложен дејству земљишта богатог глином одликује пукотинама најмањег дијаметра (Табела 4.1.5.).

Табела 4.1.5. Интервал промене дијаметра пукотина дентину у различитим медијумима



Ефекти дејства медијума на елементарни састав површине дентина узорака зуба анализирани су поређењем елементарног састава дентина нетретираног узорка зуба са елементарним саставом дентина узорака зуба који су били изложени дејству медијума у периоду од три месеца. EDS спектри нетретираног и узорака зуба који су били одложени у земљишним и воденим медијумима у наведеном периоду приказани су на слици 4.1.16.



Слика 4.1.16. EDS спектри: а) нетретирани зуб, б) зуб изложен урбаном градском земљишту, в) зуб изложен земљишту богатом глином and г) зуб изложен земљишту богатом крчаком, д) зуб изложен воденом медијуму “aqua viva”, ж) зуб изложен воденом медијуму моделу кишнице у тромесечном периоду

EDS спектри показују локалне промене у садржају метала на површини дентина узорака зуба који су били изложени дејству свих медијума. Наиме Al, Mg, Si и трагови Fe се могу приметити на минералном ткиву изложеном дејству урбаног градског земљишта, Mg и Na се детектују на зубним ткивима изложеним дејству глиненог медијума и воденом медијуму „aqua viva“, Mg, Na и Si се уочавају на дентину

изложеном дејству кречњачког земљишта, док се на површини минералног ткива зуба који је изложен дејству воденог медијума модела кишнице, детектују алкални метали Na и K и неметал Cl.

Коштано ткиво костију и зуба које је одложено у земљишту може подлећи променама у минералном саставу које се заснивају на измени јона са околном средином; промене зависе од температуре земљишта, pH и присуства воде (Castro *et al.*, 2010). Наведене промене у елементарном саставу на површини дентина узорка зуба који су били изложени дејству медијума потичу од адсорције која се дешава на површинама дентина. Мали полупречник K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Al^{3+} јона омогућава им да лако мигрирају из околне средине медијума на површину зуба (Nikolić *et al.*, 2012), нарочито из средина које садрже значајну количину ових јона. И поред високог садржаја гвожђа у градском земљишту и земљишту са значајним садржајем кречњака, депозит овог метала на дентину уочава се само код узорка зуба који је био одложен у градском земљишту у периоду од три месеца. Примећено је да сви земљишни медијуми у знатној мери садрже Ca и Mg, сходно томе је измерен и повећан садржај ових метала у свим узорцима зуба који су били изложени дејству медијума, услед акумулације магнезијума на површини скоро свих узорка зуба. Услед повећаног садржаја Mg у воденом медијуму „aqua viva“, уочава се извесна количина овог метала на површини зуба. Кристални депозит на површини дентина који је био изложен дејству модела кишнице може се објаснити таложењем и кристализацијом различитих соли. Наиме, присуство соли Na_2SO_4 , $NaCl$ и KNO_3 у медијуму модела кишнице, има утицај на равнотежну концентрацију ортофосфатних и калцијумових јона ослобођених из хидроксиапатита. Разлог овоме јесте специфични афинитет неких јона, нпр. сулфатног или хлоридног према апатиту (Dorozhkin, 2012).

Теоријска вредност стехиометријског односа Ca/P у хидроксиапатиту костију износи 2,15 и било каква измена овог стехиометријског односа у хидроксиапатиту указује на дијагенезу (Castro *et al.*, 2010). Однос Ca/P у нетретираном дентину, у свим испитиваним узорцима зуба који су били изложени тромесечном дејству различитих медијума, проценат измене овог односа, као и тенденција његове измене приказани су у табели 4.1.6. У узорку нетретираног зуба овај однос измењен у односу на теоријску вредност. Измене у хемијском саставу дентина могу повећати његову пермеабилност и растворљивост (Soares, 2009). На апатиту који је био изложен дејству раствора који су неутрални или слабо кисели, може доћи и до сорпције воде и анјона и формирање међупростора чврсто/течно и различитих слојева: Nernst-ов дифузионог, електричног

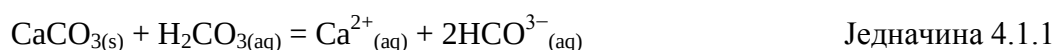
двојног слоја и др. Транспорт јона се дешава увек јонском дифузијом кроз Nernst-ов дифузиони слој. У случају смањења величине кристала и повећања интензитета агитације, овај слој се смањује, али никада не достиже вредност нула. Градијент концентрације је увек присутан на граници фаза, те према одговарајућим законима дифузије долази и до деградације апатита. Сличан приступ се може применити и на саму површину апатита – када се деси разлагање, адсорпција и десорпција јона, као и хемијске трансформације, увек се дешавају на површини без обзира на експерименталне услове (Dorozhkin, 2012).

Након тромесечног периода, најинтензивнија промена стехиометријског односа Ca/P у односу на стехиометријску вредност јесте на површини дентина који је био изложен дејству земљишног медијума богатог кречњаком, док се најмања промена овог односа запажа за узорку дентина који је био изложен воденом медијуму модела кишнице. Узорци дентина из осталих медијума имају измењен однос калцијума и фосфора до 20%.

Табела 4.1.6. Однос Ca/P у испитиваним узорцима минералног ткива зуба након тромесечног периода одлагања у земљишним медијумима: урбано градско земљиште, земљиште богато глином, земљиште богато кречњаком; воденим медијумима: комерцијалан вода “aqua viva” и медијум модел кишнице

		Ca (wt%)	P (wt%)	Ca/P	% измене односа Ca/P	раст/опadaње односа Ca/P
Медијум	Контрола	15,98	8,27	1,93	/	/
	Градско земљиште	26,75	11,56	2,29	19,68	↑
	Земљиште богато глином	22,29	10,53	2,12	9,85	↑
	Земљиште богато кречњаком	44,78	9,35	4,79	147,69	↑
	Комерцијална вода „aqua viva“	20,74	13,13	1,59	17,61	↓
	Водени медијум модела кишнице	24,30	13,37	1,82	5,70	↓

Висок садржај Са у површинском слоју дентина зуба који је био изложен дејству кречњачког земљишта може се објаснити адсорпцијом вишка калцијума насталог благим и делимичним растварањем калцијум-карбоната у медијуму кречњачког земљишта са дејонизованом водом. Разлагање карбоната је могуће у природним системима у присуству воде и угљен диоксида из атмосфере (под дејством наглађене H_2CO_3), према једначини 4.1.1. која представља реверзибилну реакцију (Lal, 2006).



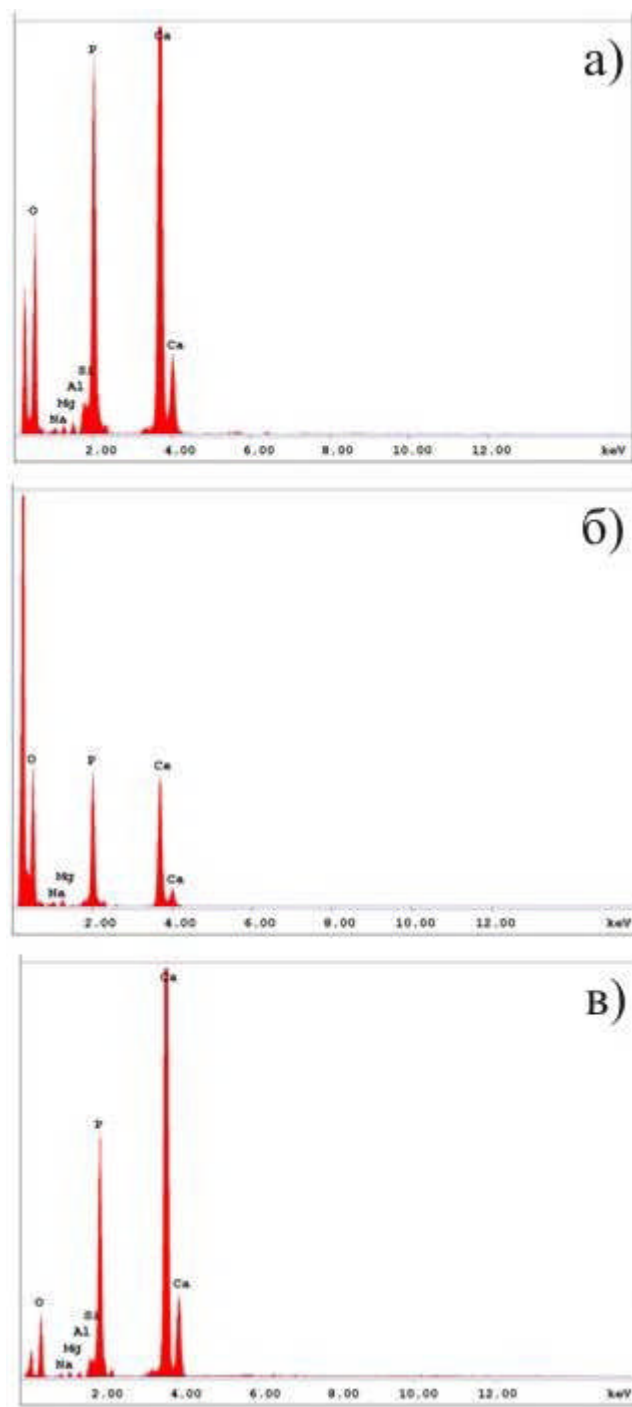
Са друге стране, не постоји јединствена једначина која може дати корелацију између површине калцита и састава раствора у коме се кречњак налази. (Morse and Ardvson, 2002).

Повећан однос Са/Р на површини дентина који је био изложен дејству земљишта медијума богатог глиненим минералима, потиче од повећања количине Р која се адсорбује у облику фосфата из органске материје којом обилује поменути медијум, као и од адсорпције калцијумовог јона из земљиште на дентин. (Andjić, 1990). Сорпција воде и анјона је олакшана у киселим земљиштима (Dorozhkin, 2012) и касније узрокује сорпцију калцијума. Повећање садржаја калцијума на дентину који је био изложен дејству земљишних медијума је у сагласности са високим садржајем калцијума у земљишту.

Повећање количине Р који се адсорбује на површини дентина, као и могуће супституција Ca^{2+} јона на површини дентина јонима Na^+ и Mg^{2+} у узорку дентина зуба који је био одложен у воденом медијуму „aqua viva“, као и супституција јонима Na^+ и K^+ у узорку дентина зуба који је био одложен у медијуму модела кишнице, одговарни су за смањење односа Са/Р (Andjić, 1990).

Након шестомесечног дејства земљишних медијума на дентин зуба примећене су промене у елементарном саставу и измењен однос Са/Р у односу на вредности наведених параметара након тромесечног стајања. На слици 4.1.17. приказани су EDS спектри дентина зуба који су у периоду од шест месеци били изложени дејству урбаног градског земљишта (Слика 4.1.17.а), земљишта богатом глином (Слика 4.1.17.б) и земљишта богатом кречњаком (Слика 4.1.17.в). У дентину који је био изложен дејству урбаног градског земљишта у периоду од шест месеци не детектује се гвожђе, које се као елемент у траговима појавио у истом узорку након тромесечне изложености

поменутом медијуму. Сходно томе, на основу садржаја овог метала не може се констатувати правилност у понашању за системе земљиште – биометал – биосистем коштаног ткива зуба. Дентин који је био изложен дејству земљишта богатог глином у периоду од шест месеци има исти елементарни састав као и дентин након тромесечне изложености истом медијуму. У дужем временском периоду изложености утицају медијума, долази до хидролизе, растварања, коагулације, адсорпције/десорпције, комплексирања, хидратације, па се као резултат ових процеса дешава миграција јона метала. Разлика у елементарном саставу се уочава код дентина који је био изложен дејству земљишта богатог кречњаком јер се десило излуживање малих количина алуминијума из земљишта на дентин узорка зуба. Мали дијаметар Al^{3+} јона омогућава да лако мигрира из околне средине медијума на површину зуба (Nikolić *et al.*, 2012). Обзиром на то да сви земљишни медијуми у знатној мери садрже Mg, и након шестомесечног стајања дентина зуба у овим медијумима, примећује се депозит магнезијума на површини дентина, што значи да се тенденција таложења овог метала наставља у току повећаног времена изложености дентина дејству земљишних медијума.



Слика 4.1.17. EDS спектри за а) зуб изложен урбаном градском земљишту, б) зуб изложен земљишту богатом глином, в) зуб изложен земљишту богатом крчаком у периоду од шест месеци

Однос Ca/P у нетретираном дентину, у свим испитиваним узорцима зуба који су били изложени шестомесечном дејству земљишних медијума, проценат измене овог односа, као и тенденција његове измене приказани су у табели 4.1.7. Тенденција

промена односа Са/Р у дентину након шестомесечне изложености земљишним медијумима је претежно измењена у односу на исту након тромесечног дејства ових медијума. Однос Са/Р у свим узорцима дентина који су били изложени шестомесечном дејству земљишних медијума има мању вредност у односу на исту, измерену након тромесечног стајања дентина у поменутих медијумима. За узорке дентина који су били одложени у урбаном градском земљишту и глиненом земљишту у периоду од шест месеци, овај однос је мањи од истог за контролни узорак. У узорку дентина који је био одложен у земљишту богатом кречњаком у периоду од шест месеци, однос Са/Р је ипак већи од истог у нетретираном узорку дентина.

Табела 4.1.7. Однос Са/Р и промена његове вредности у испитиваним узорцима минералног ткива зуба након шестомесечног периода одлагања у земљишним медијумима

		Са (wt%)	Р (wt%)	Са/Р	% измене односа Са/Р	раст/опadaње односа Са/Р
Контрола		15,98	8,27	1,93	/	/
Медијум	Градско земљиште	29,55	15,64	1,88	2,52	↓
	Земљиште богато глином	17,93	14,86	1,21	37,06	↓
	Земљиште богато кречњаком	48,26	15,35	3,14	62,69	↑

Утврђено је да постоји тенденција опадања односа Са/Р у узорцима дентина који су у шестомесечном периоду били одложени у свим земљишним медијумима, у односу на однос ова два елемента у узорцима дентина који су тромесечном периоду одлагани у истим медијумима. Најинтензивније опадање поменутог односа дешава се код дентина који је био изложен дејству земљишта богатог глином (41,55%), мањи степен опадања забележен је код дентина који је био изложен дејству кречњачког земљишта (34,44%), док је најмањи степен измене забележен за дентин који је био одложен у урбаном градском земљишту (17,9%) (Табела 4.1.8.).

Табела 4.1.8. Садржај Са и Р, однос Са/Р за периоде излагања од три и шест месеци и проценат смањења односа Са/Р

		Контрола	Медијум		
			Градско земљиште	Земљиште богато глином	Земљиште богато кречњаком
3 месеца	Ca (wt%)	15,98	26,75	18,02	44,78
	P (wt%)	8,27	11,56	10,53	9,35
	Ca/P	1,93	2,31	1,71	4,78
6 месеци	Ca (wt%)	15,98	29,55	17,93	48,26
	P (wt%)	8,27	15,64	14,86	15,35
	Ca/P	1,93	1,88	1,21	3,14
Опадање Ca/P (%)		/	17,9	41,55	34,44

Разлог за ово лежи у знатном повећању количине фосфора у дентину након шестомесечног одлагања у свим земљишним медијумима. Количине калцијума само незнатно варирају. Повећање количине фосфора у свим узорцима дентина који су били изложени дејству земљишних медијума је у корелацији са садржајем органске материје у тим медијумима. Евидентна униформност у понашању фосфора потиче од чињенице да се исти адсорбује на површини дентина из земљишне органске материје (Andjić, 1990). Повећање количине фосфора које се уочава на EDS спектрима у сагласности је са променама у изгледу, облику и интензитету трака карактеристичних за валенционе вибрације фосфатне групе на IR спектрима узорака дентина који су у шестомесечном периоду били одложени дејству медијума.

Овакви резултати указују на закључак да је на дентину узорка зуба дошло до дијагенезе. Разлика у количинама фосфора која настаје као последица различитих интензитета адсорпције овог елемента на узорке дентина који су били изложени дејству различитих земљишних медијума, може се искористити за извођење општег закључка о врсти земљишног медијума који је интераговао са дентином. Треба нагласити да се значајни закључци могу извести за узорке дентина који су стајали шест месеци у

различитим земљиштима, и могу се потенцијално искористити у форензичким истраживањима и формирању јединствених закључака о размени материје између земљишта и дентина зуба као посматраног биоматеријала.

4.1.4. Праћење интеракције медијуми – биометали – биоматеријал зуба

Садржај биометала детектован у контролном узорку минералног коштаног ткива зуба и у зубним ткивима која су била изложена дејству земљишних медијума приказан је у табели 4.1.9.

Табела 4.1.9. Садржај биометала у узорцима минералног коштаног ткива зуба који су били изложени утицају земљишних медијума

	Контрола	Медијум		
		Градско земљиште	Земљиште богато глином	Земљиште богато кречњаком
Ca [mg/g]	293,94±34,47	477,52±19,17*	327,5±11,55***	372,00±15,37*
Mg [mg/g]	5,50±1,20	8,63±1,56*	8,74±1,09*	6,58±0,37***
Cu [µg/g]	37,93±5,96	14,47±3,41*	31,56±4,41***	22,85±2,96*
Fe [µg/g]	36,52±6,05	105,24±10,34*	21,52±2,55*	117,80±17,32*
Zn [µg/g]	0,53±0,08	0,22±0,02*	0,55±0,02**	0,368±0,02**
Pb [µg/g]	4,40±0,48	5,12±0,75***	6,56±0,89***	4,37±0,48***

* p<0.01, **p<0.05, ***p<0.1

Садржај биометала детектован у контролном узорку минералног коштаног ткива зуба и у зубним ткивима која су била изложена дејству водених медијума приказан је у табели 4.1.10.

Табела 4.1.10. Садржај биометала у узорцима минералног коштаног ткива зуба који су били изложени утицају водених медијума

	Контрола	Медијум	
		Комерцијална вода „aqua viva“	Водени медијум модела кишнице
Ca [mg/g]	293,94±34,47	332,00±15,01***	401,78±1164*
Mg [mg/g]	5,50±1,20	8,12±0,68*	6,00±0,46***
Cu [μg/g]	37,93±5,96	12,04±2,38*	11,98±2,28*
Fe [μg/g]	36,52±6,05	34,84±3,99	33,26±3,09
Zn [μg/g]	0,53±0,08	0,36±0,02**	/
Pb [μg/g]	4,40±0,48	4,22±0,58***	4,32±0,46***

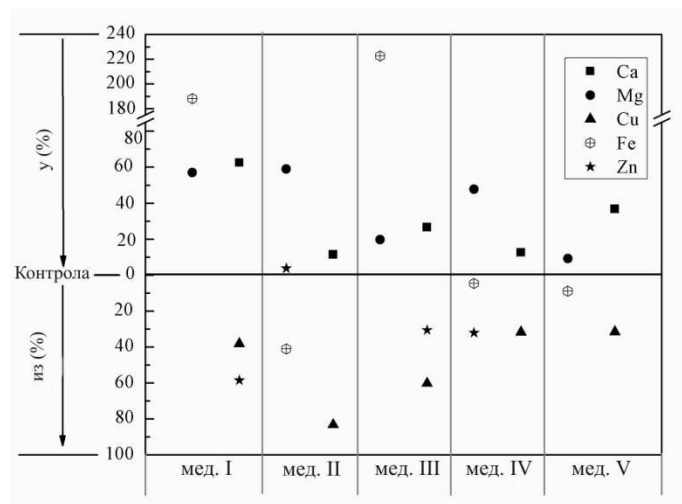
* p<0.01, **p<0.05, ***p<0.1

Проценат миграције јона биометала у- и из- минералног ткива зуба које је било изложено различитим земљишним и воденим медијумима, је прорачунат према једначинама 4.1.2. и 4.1.3:

$$У [\%] = \frac{X-Y}{Y} \times 100\% \dots\dots\dots(4.1.2.)$$

$$ИЗ [\%] = \frac{Y-Z}{Y} \times 100\% \dots\dots\dots(4.1.3.)$$

где је: X – пораст вредности садржаја метала у поређењу са контролним узорком; Y – садржај метала нетретираног ткива зуба (контролни узорак) и Z – опадање вредности садржаја метала у поређењу са контролним узорком. Резултати су приказани на слици 4.1.18.



Слика 4.1.18. Проценат миграције биометала у систему минерално ткиво зуба-земљишни и водени медијуми (мед. I: урбано градско земљиште, мед. II: земљиште богато глином, мед. III: земљиште богато кречњаком, мед. IV: комерцијалан вода „aqua viva“, мед. V: модел кишнице)

Резултати у табелама 4.1.8. и 4.1.9. су приказани као средња вредност $\pm$ SD (n-број проба, n=5).

На основу приказаних резултата, види се да се садржај Са и Mg у зубима повећава након стајања зуба у свим земљишним и воденим медијумима. Садржај ових метала у наведеним случајевима расте од отприлике 9% до 60% (Слика 4.1.18.). Према томе, Са и Mg имају исту, статистички значајну, тенденцију миграције из земљишних ($p < 0,01$) и водених ($p < 0,1$) медијума у минерални дентални материјал. Разлог овоме је то што анализирани модел медијуми у овом експерименту садрже релативно високе концентрације ова два метала. Још један од разлога је и велики масени удео коришћених медијума у односу на коштано ткиво зуба у припремљеним модел системима (масени однос медијум : зуб = 100 : 1).

Највећа количина Са се адсорбује из урбаног градског земљишта, док земљиште претежно кречњачког састава садржи вероватно, већи део Са у облику слабије растворних соли. На миграцију јона калцијума и магнезијума из земљишта утичу бројни фактори: киселост средине, концентрација осталих присутних јона, присутна органска материја, минерални матрикс земљишта, температура и други.

Бакар је биоелемент, присутан у организму у малим количинама од 2 mg/L серума, али се током година живота, у контакту са храном и оралним течностима, акумулира поред осталих ткива и у минералном ткиву зуба (37,93 $\mu\text{g/g}$) (Nikolic, 2011). Када се такав минерални биоматеријал нађе у спољашњој средини бива изложен

утицају исте и долази до статистички значајног излуживања и опадања нивоа Cu^{2+} јона ($p < 0,01$). Садржај бакра опада услед његове миграције из минералног ткива зуба у спољашњу средину, без обзира на врсту медијума, од 30% до 80% (Слика 4.1.18.). Обзиром на то да је Cu^{2+} малих димензија лако се може заменити у структури НАр што доводи до његове даље миграције (Wells, 1946). Резултати мерења садржаја овог метала у узорцима минералног ткива зуба који су били изложени дејству различитих медијума указују да се садржај бакра смањује, тј. да бакар, независно од типа медијума, мигрира из зуба у околну средину. Ова тенденција миграције бакра дешава се у циљу успостављања равнотеже, као и због потенцијалних интеракција и комплексирања јона бакра са компонентама из органске материје земљишта земљишта, могуће размењиве адсорпције овог метала (Nikolic *et al.*, 2011), као и копреципитације у земљишту богатом карбонатима, услед грађења хидроксикарбоната. Тенденција грађења ових једињења већ је забележена у литератури (Bodek, 1988).

Гвожђе из земљишта претежно кречњачког састава, анализираног у овом раду, је релативно доступно и бива адсорбовано на биолошком материјалу у већој количини, тако да се његов садржај у минералном ткиву повећава статистички значајно ($p < 0,01$), и до три пута (од 36,52 до 117,80 $\mu\text{g/g}$). Садржај глинених минерала каолинита и смектита поред фелдспата и других минерала у земљишту, због посебне структуре алумосиликата, погодује везивању јона већег наелектрисања, што доводи до смањења садржаја гвожђа у минералном матриксу анализираног биоматеријала и вероватно везивања истог у стабилнији алумосиликатни матрикс (Spears, 2011; Outerbridge, 1996). Тако смањење садржаја гвожђа у минералном матриксу анализираног биоматеријала износи 41% за зубно ткиво одложено у земљишту богатом глином (Слика 4.1.18.). Овај тип земљишта је био и са вишим садржајем органске материје у односу на друге типове земљишта, па има и потенцијално израженију способност за интеракције јона гвожђа са О-донор атомима органске материје земљишта, и грађење комплексних и тешко растворних једињења. Тенденција интеракције гвожђа са кисеоником органске материје забележена је у литератури (Kabata-Pendias, 2007). Због велике разлике у садржају Fe у минералном ткиву и воденим медијумима, током тромесечног периода излагања утицају ових медијума, садржај јона гвожђа у минералном ткиву опада, услед дифузије истог у окружујућу водену средину, што износи мање од 10% (Слика 4.1.18.). Испитивања измене двовалентних катјона у синтетичком НАр показала су да измене зависе од интеракције $\text{M}^{2+}\text{--O}$ (О најближи атоми из PO_4^{3-} групе НАр), и да су енергетски повољнији процеси измене Ca^{2+} већим катјонима (Pb^{2+} , Cd^{2+}) у слабо базној

средини, а измена јона мањих димензија иде са мањом тенденцијом у слабо киселој средини (Matsunaga, 2008; Sugiuama, 2000; Sugiuama, 2002; Yasykawa, 2008).

Цинк је биометал присутан у малим количинама у организму, али уношењем преко хране и оралних течности временом долази до његове акумулације у минералним ткивима, а средња вредност овог метала у анализираном биоматеријалу је била 0,53 mg/g (Kalicanin&Nikolic, 2008). Испитивања у овом раду су показала да из земљишта богатог глиненим минералима као што су каолинит и смектит уз кварц, брукит и фелдспат (Spears, 2011; Outerbridge, 1996), са повећаним садржајем органске материје и ниже рН вредности, јони цинка мигрирају у минерално ткиво зуба ($p < 0,05$). Проценат ове миграције износи приближно 4% (Слика 4.1.18.). Разлог овоме јесте кисела средина овог земљишта и присуство других катјона, што узрокује добру покретљивост Zn^{2+} јона и изазива „цурење“ цинка и његов трансфер у минерално ткиво зуба (Kabata-Pendias& Pendias, 2000). У осталим испитиваним модел системима долази до излуживања јона цинка из минералног ткива зуба у спољашњи медијум ($p < 0,01$).

Евидентно је да одлагање минералног денталног ткива у различитим медијумима води ка размени јона између ткива и медијума, што је у сагласности са литературним подацима; процена утицаја дијагенезе је веома важна за интерпретацију елементарног састава ткива које је било изложено дијагенези (Castro *et al.*, 2010).

Олово није есенцијални елемент за живе организме, али се у исте може унети на различите начине и акумулирати током дужег периода изложености дејству овог метала. Унос олова је могућ преко хране, воде за пиће или ваздуха (Goyer *et al*, 2001). Критичном количином олова у организму сматра се садржај од 0,1 mg/L (Ahmed *et al.*, 2007). Проценат апсорпције унетог олова у организам зависи од узраста и општег физиолошког стања организма (Flora *et al.*, 2006). Као метал са кумулативним дејством, може бити конкурентан есенцијалним металима у живом свету. Резултати истраживања у овом раду приказали су сличну тенденцију, те је већ у контролном узорку дентина измерена извесна количина олова. Након тромесечног излагања узорака дентина земљишним медијумима, утврђено је незнатно повећање концентрације олова у овим узорцима, што се објашњава постојањем тенденције излуживања овог метала из земљишта и везивање истог за дентин минералног ткива зуба уместо калцијумовог јона. Излуживање олова је најинтензивније из земљишта богатог садржајем глине, обзиром на највиши садржај овог метала у поменутом земљишту. Како у воденим медијумима није детектовано присуство олова, очекивани

су резултати да се измерене концентрације олова у узорцима дентину који су били изложени дејству водених медијума незнатно разликују од концентрације овог метала у контролном узорку дентина.

Обзиром на то да су измене у садржају олова за узорке дентина који су били изложени дејству земљишних и водених медијума биле незнатне, детаљније проучавање дејства олова на биоматеријале, спроведено је на примеру крвног ткива као биометријала.

Утицај олова као токсичног метала на биосистем крви у случају његове интоксикације, испитиван је одређивањем садржаја неких крвних параметара: еритроцита (RBC) и хемоглобина (Hb) у контролним и узорцима пацова који су били подвргнути интоксикацији. Резултати су показали да је интоксикација оловом изазвала промене у хематолошким параметрима ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Значајна промена се десила код еритроцита (RBC) у виду смањења њиховог броја од $(7,38 \pm 0,34) \times 10^{12}/L$ за контролну групу животиња до $(4,68 \pm 0,26) \times 10^{12}/L$ за групу животиња подвргнутих интоксикацији оловом. Код хемоглобина (Hb) се десило снижавање нивоа од $140,17 \pm 4,45 \text{ g/L}$ до $95,67 \pm 3,33 \text{ g/L}$.

Олово је токсичан метал који, између осталог, утиче на хематолошке параметре. Утврђен је инверзни однос хематолошких параметара и токсичности олова. Еритроцити крви имају висок афинитет према олову и садрже највећу количину олова у односу на остале параметре крви (Leggett, 1993). Информације о снижењу вредности за еритроците и хемоглобин у случају интоксикације зечева оловом, приказане су и у литератури (Bergsenyi *et al.*, 2003). Отприлике 90% олова у организму се налази везано за еритроците, услед њиховог великог афинитета за везивањем тешких метала, нарочито олова. Опадање нивоа еритроцита и хемоглобина утврђено у овом експерименту било је значајно ($p < 0,01$), док је за хемоглобин износило приближно 30% у односу на контролну групу.

Интоксикација оловом изазива озбиљне поремећаје у балансу хематолошких параметара, зато што овај метал инхибира одређену фазу у синтезе хема (Nikolić *et al.*, 2013). Ефекат дејства олова на крвни систем резултује инхибицијом синтезе хема и анемијом (Gurer-Orhan *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2005). У даљем току, овакав процес негативно утиче на синтезу хемоглобина и узрокује деструкцију еритроцита, инхибицијом синтезе три ензима у његовом биосинтетском путу: порфибилиноген синтазе, копорфиноген оксидазе и ферохелатазе. Утврђено је да је ензим ферохелатаза,

који контролише инкорпорирање гвожђа у протопорфирин, осетљивији на ефекте олова уз присутни дефицит гвожђа (Piomelli, 1998).

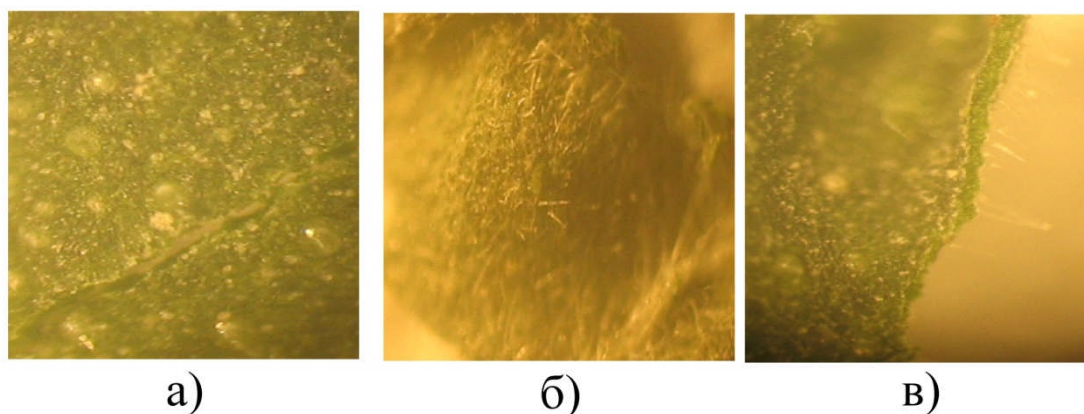
Ензим који катализује реакцију синтезе профибилиногена (порфибилиноген синтаза) има Zn^{2+} јон. Деловање олова је најнефективније на овај ензим. На молекуларном нивоу, олово замењује цинк на местима за његово везивање узрокујући инхибицију променама у кватернарној структури ензима (Kelada *et al.*, 2001).

4.2. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА У МОДЕЛ СИСТЕМУ: ЗЕМЉИШТЕ – БИОМЕТАЛИ – БИЉНА ВРСТА *Cannabis sativa* L.

4.2.1. Идентификација биоматеријала биљне врсте *Cannabis sativa* L.

Макроскопским прегледом листова биљне материје уочене су јасно изражене морфолошке структуре листова. Листови су наспрамни и имају лисну дршку. Уочено је да је лиска прстасто дељена у 3 до 9 ланцетастих, назубљених режњева. Овакве описе за лист биљке *Cannabis sativa* L. налазимо у литератури UNODC (2009).

На слици 4.2.1. приказан је микроскопски изглед површине листа: а), наличија листа: б) и попречног пресека листа: в) проучаваних биљака које су идентификоване као *Cannabis sativa* L. На површини листова се могу идентификовати



Слика 4.2.1. Изглед површина а) лица, б) наличија и в) попречног пресека листа биљне врсте *Cannabis sativa* L.

микроскопски израштаји (трихоми) у виду длака из биљних епидермалних ћелија. Трихоми са цистолитима (крстали калцијум-карбоната) су уочени на горњој површини листа. Не-цистолитни трихоми су уочени на наличју листа. Истовремено

присуство трихома са цистолитима на лицу и танких не-цистолитних трихома на наличју листа је потврдило идентификацију предметних биљака као Cannabis-a UNODC (2009).

Специмен биљне врсте *Cannabis sativa* је депонован у депозиту колекције хербаријума Природно-математичког факултета у Нишу под идентификацијомим бројем RSN0113.

4.2.2. Одређивање садржаја биометала у земљишту и биоматеријалу *Cannabis sativa* L.

Садржај биометала одређен у сертифицикованим референтим материјалима узорак лишћа и земљишта, као и *recovery* вредности приказани су у табели 4.2.1.

Табела 4.2.1. Анализа метала у стандардном референтном материјалу лишћа и земљишта

	NIST SRM 1547 лишће			NIST SRM 2711 земљиште		
	Измерено	Сертифициковано	<i>Recovery</i> %	Измерено	Сертифициковано	<i>Recovery</i> %
Cu [mg/kg]	3,2±0,9	3,7±0,4	86	96±10	114±2	84
Fe [mg/kg]	197±6	218±14	90	3,8±0,1	2,89±0,06	131
Mn [mg/kg]	70,5±0,9	98±3	72	398±13	638±28	62
Zn [mg/kg]	15±1	17,9±0,4	84	317±12	350,4±4,8	90
Cr [mg/kg]	2,85±0,03	/	/	22±2	47	47
Ca [%]	1,01±0,07	1,56±0,02	65	1,34±0,09	2,88±0,08	47
Mg [%]	0,456±0,007	0,432±0,008	106	0,725±0,009	1,05±0,03	69

Резултати мерења садржаја метала у ризосфери и деловима биљке Cannabis: корен, стабло и лист за све испитиване узорке су дати у табели 4.2.2. Генерално, измерене вредности метала у различитим врстама земљишта у којима су биљке биле гајене су у оквиру очекиваних вредности наведених у литератури (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Вредности бакра су измерене у опсегу од 8,0 до 54,6 mg/kg; концентрације гвожђа су биле ниске: од 1026 до 7626 mg/kg; вредности мангана су биле ниже од очекиваних и варирале су од 67 до 1729 mg/kg; вредности цинка су,

такође, биле ниже од очекиваних и у опсегу од 30 до 161 mg/kg; док је хром варирао у опсегу концентрација од 5 до 74 mg/kg. Вредности за калцијум и магнезијум су у опсегу од 15283,63 до 38195700 mg/kg и од 2284,09 до 12045,13 mg/kg. Концентрације Cu и Mn имају углавном константне вредности у лишћу без обзира на концентрације ових метала у земљишту или у другим деловима биљке, док је садржај бакра мањи од садржаја мангана. Cr и Fe су присутни у деловима биљне врсте Cannabis у мањим концентрацијама него у земљишту; само је хром био апсорбован од стране корена биљака у већој количини, мада је његова концентрација нижа у односу на количине осталих испитиваних метала. Гвожђе показује вишу концентрацију у односу на остале испитиване метале. Концентрације цинка су углавном стабилне у лишћу, док за остале делове нема специфичних закључака. Садржај Ca и Mg је висок у земљишту и сходно томе и у деловима биљке, нарочито у лишћу. Просечне концентрације свих испитиваних метала у деловим Cannabis, нарочито у лишћу, су биле углавном у следећем односу: Ca и Mg > Fe > Mn > Zn > Cu > Cr.

Дистрибуција метала у лишћу биљке Cannabis је већ мерена од стране Eboh & Thomas (2005) за биљке које су гајене у спољашњим условима. Значајне разлике у садржају метала су уочене за Cannabis које је гајен у спољашњим условима са једне стране, и Cannabis гајен у затвореним контролисаним условима. Наиме за биљке гајене у контролисаним условима бакар је био у опсегу концентрација 18,4 до 39,8 mg/kg. Овакав Cannabis је показивао више вредности за гвожђе и манган у опсезима од 238 до 1284 и од 153,7 до 340,8 mg/kg, али ниже вредности за хром од 2,42 до 12,86 mg/kg. Концентрације цинка су биле у опсегу од 48 до 89 mg/kg, док су вредности калцијума и магнезијума биле у интервалима: од 41485,83 до 75595,76 и од 4086,11 до 5329,78 mg/kg.

Табела 4.2.2. Садржај метала у ризосфери и деловима биљке Cannabis: корен, стабло и лист [mg/kg]

Број узорка	Узорак	Cu	Fe	Mn	Zn	Cr	Ca	Mg
1	земљиште	23,58	7626,21	154,61	57,88	22,14	20969,9	5465,2
2	корен	6,41	98,27	83,57	26,99	2,29	27879,6	2237,4
3	стабло	9,34	251,31	240,35	78,25	4,00	44308,5	4054,1
5	земљиште	11,67	2112,81	124,29	38,44	5,45	2894684,0	2607,7
6	корен	7,93	149,15	34,17	70,14	4,51	13083,3	979,1
7	стабло	13,09	118,99	145,67	48,57	3,32	30765,2	1596,8
8	лишће	39,84	336,21	268,48	73,04	5,63	71544,4	4086,1
9	земљиште	37,95	15087,59	1729,10	111,40	74,16	19585,0	12045,1
10	корен	25,11	550,94	49,80	71,57	6,73	266380,2	2128,2
11	стабло	17,94	205,10	112,61	40,60	6,02	34276,6	1979,9
12	лишће	20,16	1284,43	240,43	47,65	12,86	75595,8	4903,3
13	земљиште	20,98	4438,17	321,06	105,06	15,44	54885,98	4269,5
14	корен	14,93	581,98	86,73	48,14	6,95	270225,2	1734,5
15	стабло	9,08	166,41	70,23	19,09	2,77	23452,4	1656,7
16	лишће	22,89	377,71	182,88	51,67	12,30	61051,5	4537,3
17	земљиште	7,96	1025,64	67,34	29,94	10,12	38195700,0	2284,1
18	корен	12,38	485,92	48,21	26,35	4,72	13617,8	2173,1
19	стабло	12,03	173,50	99,03	15,49	3,44	22894,3	1657,6
20	лишће	20,57	560,36	153,75	54,72	3,73	41485,8	5329,8
21	земљиште	42,49	15095,47	844,21	160,79	52,76	15283,6	11298,3
22	корен	96,73	3338,81	186,44	77,95	36,20	449850,2	8389,9
23	стабло	9,73	308,98	79,61	20,16	3,62	20578,1	2856,0
24	лишће	18,42	337,66	182,76	87,62	2,42	52170,3	4701,8
25	земљиште	54,57	1153,54	106,36	70,47	14,92	38365,0	3502,0
26	корен	55,91	694,56	117,28	102,34	40,44	261458,6	3711,3
27	стабло	16,05	119,82	132,55	78,22	4,26	19444,6	1448,4
28	лишће	25,53	238,32	340,76	89,38	3,59	56411,2	5016,8
Средња вердност		24,19	2108,07	229,72	63,04	13,51	1596146,19	5016,8
SD		19,90	4092,41	338,08	33,53	17,56	7335423,04	2786,61
min		6,41	98,27	34,17	15,49	2,29	13083,3	979,1
max		96,73	15095,47	1729,10	160,79	74,16	38195700	12045,1
max/min		15,09	153,61	50,60	10,38	32,38	2919,42	12,30

Преузимање метала од стране биљака зависи од великог броја хемијских процеса и равнотежа, као што су: преципитација/растварање, комплексирање/дисоцијација и оксидација/редукција (He et al., 2005).

Концентрација јона у супстрату земљишта, према Michaelis–Menten једначини (јед. 4.2.1.), утиче, али не селективно, на преузимање метала од стране биљака. Веће концентрације могу бити апсорбоавне од оптималних концентрација које су неопходне за физиолошке функције биљака (Mengel & Kirkby, 1987; Razic et al., 2006):

$$I = \frac{(I_{\max} \cdot c)}{K_m + c} \quad (4.2.1.)$$

I – степен апсорпције јона,

$I_{\max}$ – максимум апсорпције јона,

K_m – Michaelis–Menten константа,

c – концентрација јона у региону близу корена,

Прелазни метали су важни за раст биљака и они се дистрибуирају у различитим ћелијама, у одређеним концентрацијама зависно од успостављене хомеостазе. Конопља има могућност да акумулира тешке метале. Према Linger *et al.*, (2002) највеће концентрације Cd, Pb и Ni су пронађене у лишћу. Истраживања од стране Clemens (2001) су показала да лишће Cannabis-a акумулира бакар више него остали делови биљке. Више концентрације цинка у лишћу су забележене од стране Vázquez *et al.*, (1992); Kürper *et al.*, (1999). Високе концентрације Cd, Cr, Ni, Fe, Pb и Hg су детектоване од стране Eboh & Thomas, (2005) у лишћу поменуте биљке одгајане у Нигерији. Према истраживањима Khan *et al.*, (2008) мерен је ниво Cd, Cr, Ni, Fe, Pb, Mn, Zn, Cu и Co у различитим деловима биљке Cannabis и у земљишту које је било контаминирано. Закључено је да су концентрације наведених метала у биљци изнад дозвољених вредности које се очекују за биљне врсте гајене на неконтаминираним подлогама. Различите биљке Cannabis садрже различите садржаје бакра услед различите концентрације овог метала у земљишима у којима су ове биљке биле гајене; концентрација бакра су у следећем односу: корен>лишће>стабло, док за цинк и хром нема утврђене законитости односа концентрација у деловима биљке Cannabis (Khan *et al.*, 2008). Акумулација метала у биљкама може бити базирана на различитим стратегијама, као што су везивање за ћелијски зид или локализација у апопластима (Arru *et al.*, 2004).

Истраживања у овој дисертацији су потврдила чињеницу да преузимање метала од стране биљке зависи од садржаја метала у земљишту. Ниво свих испитиваних метала је био већи у лишћу него у стаблу, сем за хром, док је ниво цинка био већи у корену него у стаблу за све испитиване биљке Cannabis. Сем за манган, ниво свих испитиваних метала је код већине испитиваних биљака био већи у корену него у стаблу.

4.2.3. Одређивање садржаја канабиноида у биоматеријалу *Cannabis sativa* L.

Иако је садржај метала измерен у различитим деловима биљака *Cannabis*, садржај канабиноида је измерен само у листовима, обзиром на то да се наведена једињења у корену налазе у малим количинама, док стабло и гране садрже канабиноиде мање него лисна маса (Pate *et al.*, 1994). Садржај канабиноида у лишћу испитиваних биљака *Cannabis* је приказан у табели 4.2.3. Ретенциона времена канабиноида су: 7,5; 7,9 и 8,3 min за CBD (канабидиол), THC (тетрахидроканабинол) и CBN (канабинол).

Табела 4.2.3. Садржај канабиноида у лишћу биљака *Cannabis sativa* [mg/mL]

Број узорка*	THC**	CBD***	CBN****
8	0,0417	0,5216	0,0266
12	0,0088	0,1173	0,0038
16	0,0044	0,2075	0,0114
20	0,0320	0,4262	0,0138
24	0,0846	1,1986	0,0481
28	1,4781	0,2537	0,0553

* анализирано је само лишће, ** тетрахидриканабинол, *** канабидиол, **** канабинол

Резултати анализе показују, да је у скоро свим испитиваним биљкама садржај канабинола (CBN) нижи од садржаја тетрахидроканабинола (THC), док је његов садржај нижи од садржаја канабидиола (CBD). Релативно низак садржај све три врсте канабиноида у испитиваним узорцима је очекиван обзиром на то да је анализа предметних биљака извршена у њиховом раном вегетативном периоду.

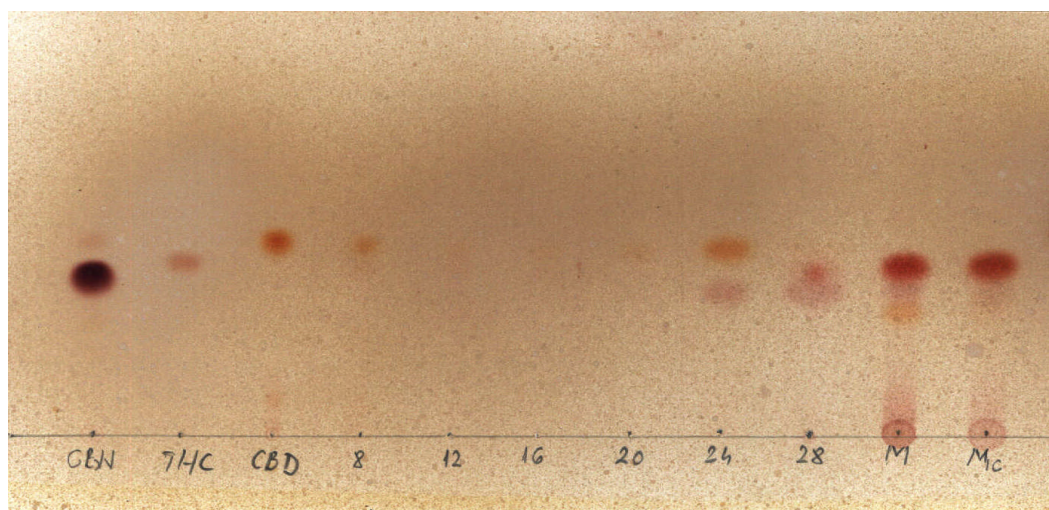
Као и према Elsohly & Slade (2005), у скоро свим испитиваним биљкама, ниво психоактивног THC је био нижи од нивоа CBD, док су вредности за CBN биле ниже од вредности за THC. Најнижи ниво CBN у односу на остале канабиноиде је очекиван, обзиром на то ниво овог канабиноида расте током старења и складиштења биљке *Cannabis*, јер он представља примарни деградациони производ Δ^9 -THC (Baker, 1980). Висок ниво CBN може бити индикатор старости биљке или лоших услова складиштења биљног материјала након бербе. Према Djurdjenovic-Brenesel *et al.*, (2010) постоје велике варијације садржаја канабиноида и њихових количина у биљкама врсте *Cannabis sativa*. Различити фактори узрокују ове варијације: генетска карактеристика семена (Bouquet, 1950; Grlic, 1954; Taylor *et al.*, 1985; Pitts *et al.*, 1985), услови околне

средине, као што су: светлост, температура, влага, и кисеоник (Mechoulam, 1973; Nahas, 1978), као и зрелост биљке (Baker *et al.*, 1980). Вегетативни период биљке у коме је извршено узорковање, време које протекне од момента бербе до момента анализе, као и услови складиштења већ убране биљне материје су значајан фактор утицаја на количину канабиноида у биљкама (Baker *et al.*, 1980). Као најбитнији фактор од наведених разматрају се генетске особине биљке (Fetterman *et al.*, 1971). Такође, генерација биљке је значајан фактор високог садржаја канабиноида, јер је утврђено да биљке треће генерације показују пораст у садржају канабиноида, док је у петој генерацији забележен изразито висок садржај Δ^9 -THC (Pitts *et al.*, 1992).

Нема детаљних истраживања о томе како садржај појединих метала у земљишту и самој биљној врсти *Cannabis* утиче на садржај анализираних канабиноида у лишћу поменутог биљног материјала.

4.2.4. Упоредивање садржаја канабиноида у различитим биоматеријалима биљне врсте *Cannabis sativa*

За потребе упоређивања садржаја канабиноида, нарочито садржаја психоактивне супстанце третрахидроканабинола у различитим узорцима биоматеријала биљне врсте *Cannabis sativa* којима се разликује старосно доба, употребљена је семиквантитативна метода танкослојне хроматографије (TLC) (МУП Р. Србије, 2013). Применом ове методе приказана је разлика у садржају канабиноида у предметним узорцима биљне материје *Cannabis* (узорци број 8, 12, 16, 20, 24 и 28), узорку који је анализиран три године после бербе (М) и узорку чија је анализа спроведена у кратком временском интервалу након бербе (Мс). На слици 4.2.2. приказана је TLC плочица на којој се на одговарајућим R_f вредностима виде мрље сертификованих реферетних материјала, предметних узорака и узорака који имају изразито висок садржај психоактивног тетрахидроканабинола.



Слика 4.2.2. TLC плочица на којој су сертифицировани реферетни материјали канабиноида (CBN: канабинол, THC: тетрахидроканабинол, CBD: канабидиол), предметни узорци (8, 12, 16, 20, 24, 28) и узорци који имају изразито висок садржај психоактивног тетрахидроканабинола (M и Mc)

У табели 4.2.4. интерпретирани су резултати примене семиквантитативне методе танкослојне хроматографије, у смислу садржаја три најважнија канабиноида.

Табела 4.2.4. Интерпретација резултата примене семиквантитативне методе танкослојне хроматографије

Обележје узорка	Садржај канабинола	Садржај тетрахидроканабинола	Садржај канабидиола
CBN*	80 ng	/	/
Δ^9 -THC**	/	50 ng	/
CBD***	/	/	60 ng
8	н.д.	н.д.	Детектовано присуство
12	н.д.	н.д.	н.д.
16	н.д.	н.д.	н.д.
20	н.д.	н.д.	Детектовано присуство
24	Детектовано присуство	н.д.	Детектовано присуство
28	Детектовано присуство	Садржај већи од 0,3%	н.д.
M	Детектовано присуство	Садржај већи од 0,3%	н.д.
Mc	н.д.	Садржај већи од 0,3%	н.д.

* канабинол, **тетрахидрикаанабинол, *** канабидиол, н.д. – није детектовано

Семиквантитативном методом танкослојне хроматографије утврђено је да предметни узорци под бројем 12 и 16 имају садржај сва три канабиноида испод границе детекције методе. Предметни узорци канабиса под бројем 8 и 20 показују садржај канабидиола већи од границе детекције методе, узорак под бројем 24 показује већи садржај канабидиола и канабинола од границе детекције методе, док узорак број 28 показује већи садржај тетрахидроканабинола и канабинола од границе детекције методе, што је у сагласности са резултатима добијеним применом гасне хроматографије са пламенојонизујућом детекцијом. У узорку који је анализиран три године после бербе (М) детектован је већи садржај тетрахидроканабинола ($>0,3\%$) и присуство канабинола, при чему је садржај канабидиола испод границе детекције примењене методе. У узорку чија је анализа спроведена у кратком временском интервалу након бербе (Мс) измерен је изразито висок садржај тетрахидроканабинола ($>0,3\%$), док садржај преостала два канабиноида није детектован примењеном методом. Низак садржај канабиноида у анализираним узорцима је реално очекиван с обзиром на то да ови узорци представљају биљке у раном вегетативном периоду, па акумулација канабиноида није извршена у потпуности због прекинуте биосинтезе. Висок садржај тетрахидроканабинола у узорку који је анализиран три године после бербе (М), указује на то да се садржај психоактивног тетрахидроканабинола не снижава тако интензивно стајањем биљке. Може се, ипак, са сигурношћу закључити да је до извесног распадања тетрахидроканабинола дошло током стајања биљке, обзиром на то да се на плочици уочава мрља канабинола који је деградациони производ тетрахидроканабинола (Baker, 1980). У узорку чија је анализа спроведена у кратком временском интервалу након бербе (Мс) детектован је изразито висок садржај тетрахидроканабинола. За овај узорак је садржај канабинола испод границе детекције методе, што је очекивано обзиром на то да од момента бербе није протекло време потребно за деградацију тетрахидроканабинола у канабинол. Код оба узорка: „М“ и „Мс“ садржај канабидиола је испод границе детекције обзиром на то да ови узорци представљају зреле биљке варијетета који је добијен селекцијом и код кога је биосинтеза тетрахидроканабинола фаворизирана у односу на биосинтезу канабидиола.

Закључује се да младе биљке (узорци број 8, 16, 20, 24, 28) имају изузетно низак садржај канабиноида, док зреле биљке показују изразито висок садржај психоактивног тетрахидроканабинола. Обзиром на нижу осетљивост, евидентна је ограничена могућност примене танкослојне хроматографије као методе за анализу узорака биљне врсте *Cannabis sativa*. Са друге стране, танкослојна хроматографија је

брза и поуздана метода и не захтева посебне услове за реализацију, те је у форензичком смислу применљива и на терену.

4.2.5. Праћење интеракције земљиште – биометали – биоматеријал биљне врсте *Cannabis sativa* L.

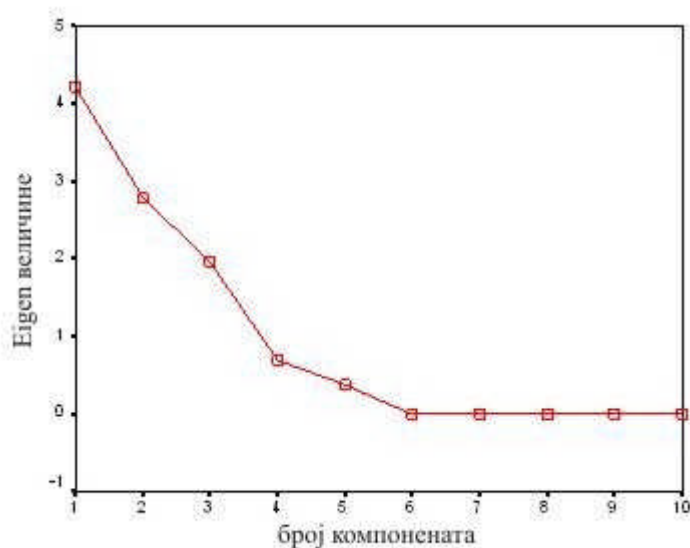
За потребе утврђивања интеракција у систему земљиште – биометали – биоматеријал *Cannabis sativa* L. извршено је одређивање корелације садржаја метала и садржаја канабиноида у поменутом биоматеријалу применом хеометријских метода анализе главних компонената (PCA).

У циљу провере дистрибуције података, најпре је примењен *Ryan-Joiner*-ов тест. Затим су, у великом сету података, одређене вредности које веома одступају (*outliers*) помоћу *Grubb*-овог теста и након тога су искључене из даље евалуације, како би се наставило са моделовањем. Основни матрикс података се састојао од узорака (редови) и метала и канабиноида (колоне). Испитане су потенцијалне корелације (*Pearson*-ове корелације) и резултати су приказани у табелии 4.2.5.

Табела 4.2.5. Корелациони матрикс метала и канабиноида (*Pearson*-ова корелација)

	Cu	Fe	Mn	Zn	Cr	Ca	Mg	THC	CBD
Fe	-0,344								
	0,505								
Mn	0,484	-0,134							
	0,331	0,800							
Zn	0,201	-0,675	0,496						
	0,702	0,142	0,317						
Cr	-0,097	0,628	-0,097	-0,775					
	0,855	0,182	0,855	0,070					
Ca	0,452	0,464	0,443	-0,224	0,649				
	0,368	0,354	0,379	0,670	0,163				
Mg	-0,724	0,272	-0,176	-0,148	-0,190	-0,622			
	0,104	0,602	0,739	0,780	0,719	0,188			
THC	0,061	-0,379	0,791	0,618	-0,373	-0,145	0,285		
	0,909	0,459	0,061	0,191	0,467	0,784	0,584		
CBD	-0,113	-0,411	-0,331	0,596	-0,659	-0,378	-0,176	-0,209	
	0,831	0,418	0,522	0,212	0,155	0,460	0,379	0,691	
CBN	0,332	-0,602	0,813	0,802	-0,545	-0,111	0,000	0,929	0,011
	0,520	0,206	0,049	0,055	0,263	0,835	1,000	0,007	0,984

У циљу екстраховања значајних коефицијената корелације, усвојен је одређени ниво значајности (0,7). Иницијална статистика *Eigen*-ове анализе корелационог матрикса је урађена и добијени резултати приказани на слици 4.2.3. (Kaiser, 1960).



Слика 4.2.3. *Eigen*-ова анализа

Према *Kaiser*-овом критеријуму, само прве три компоненте могу бити задржане јер су *Eigen*-ове вредности веће од 1. Може се видети да су четири компоненте одговорне за 89,425% укупне варијансе. Тако је добијен редукован, тродимензионални простор.

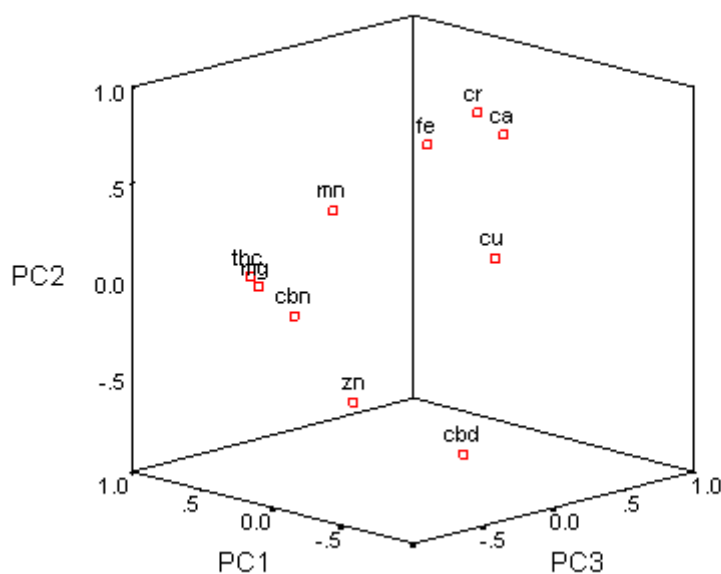
Подаци концентрација су подвргнути анализи главних компонената (PCA: principal component analysis) у циљу тога да се нагласе релације између елемената матрикса. Помоћу ове анализе је постигнута редукција броја података трансформисањем података у ортогоналне компоненте које су линеарна комбинација оригиналних варијабли. Један од главних циљева анализе главних компонената је да идентификује факторе од значаја.

У циљу добијања детаљнијег прегледа латентне структуре података, корелациони матрикс је подвргнут *Varimax* ортогоналној ротацији. Ротација координатног система фактора неће утицати на позиције објеката једних у односу на друге, али ће упростити структуру фактора (Табела 4.2.6.).

Табела 4.2.6. Матрикс после Varimax ротације

	Component		
	1	2	3
Cu	0,258	-0,091	0,842
Fe	-0289	0,790	-0,177
Mn	0,912	0,123	0,345
Zn	0,548	-0,765	0,129
Cr	-0,266	0,878	0,194
Ca	0,071	0,601	0,721
Mg	0,142	0,115	-0,965
THC	0,966	-0,134	-0,191
CBD	-0,334	-0,851	0,021
CBN	0,920	-0,380	0,081

За бољу визуелизацију Слика 4.2.4. је приказана да илуструје график компонената у ротираном простору.



Слика 4.2.4. График компонената у ротираном простору скупа података метала и канабиноида

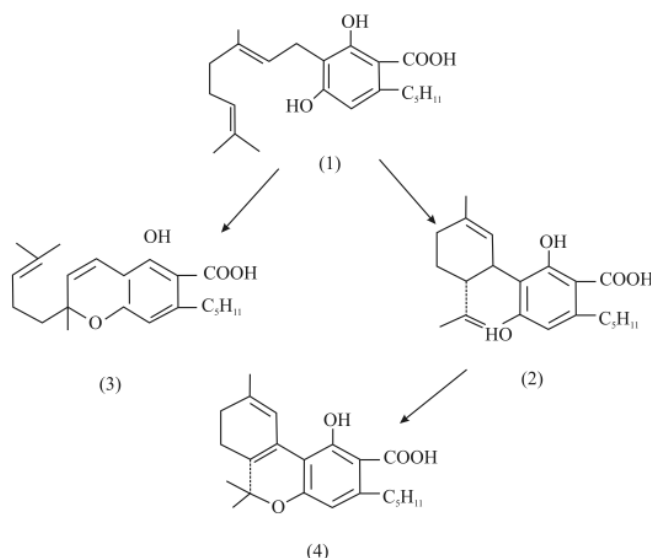
Високе позитивне и негативне вредности одређују фактор. Тако добијени фактори су повезани са извором метала и канабиноида у проучаваним узорцима.

Уколико се задржи лимит од 0,7 за коефицијент, сви остали фактори, сем првог изражавају значај појединачних елемената. Иако корелација између појединих

елемената показује да они долазе из истог извора, за преостале елементе, неки други извори би били релевантни. Први фактор упућује на добре корелације Mn, THC and CBN. Оваква корелација указује да они долазе из истог извора. Fe и Cr имају значајно позитивно слагање и негативно су корелисани према Zn и CBD са високим негативним слагањем. Трећи фактор доминантно корелира Cu као есенцијалан елемент, конституент коензима, који је значајан за биохемијске циклусе у биљкама. Он је такође високо корелисан са Mg, али негативно.

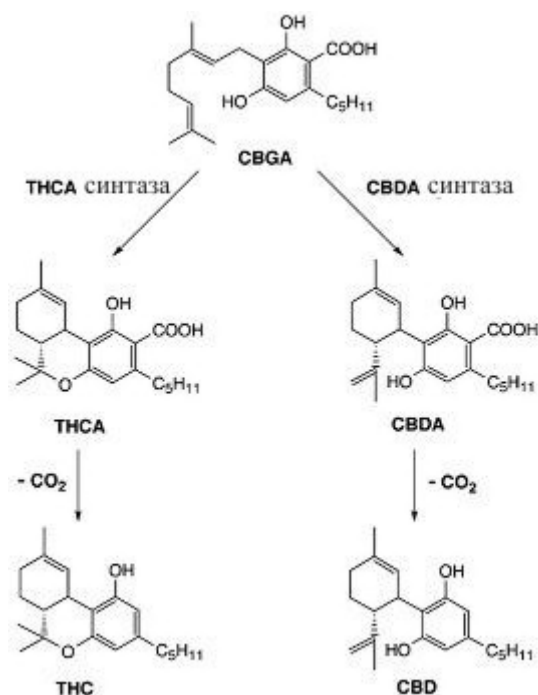
Ове корелације воде ка разматрању биосинтезе канабиноида и улози метала као кофактора у синтетичким циклусима катализованих ензимима. Уочен је значај оптималне концентрације Fe за синтезу Δ^9 -THC (Kaneshima *et al.*, 1973). За Mg и Fe је такође примећено да су од значаја за биосинтезу Δ^9 -THC уз потенцијално објашњење да оба метала могу бити кофактори ензима, док је само Mn у корелацији са CBN (Latta & Eaton, 1975). Такође је уочена негативна корелација садржаја Δ^9 -THC и CBD у лишћу са садржајем Mg у земљишту, затим негативна корелација садржаја CBD лишћа и односа Mg/Cu и Ca/Zn у земљишту, као и позитивна корелација Δ^9 -THC у лишћу и односа Ca/Mg у земљишту (Coffman & Gentner, 1975).

Taura *et al.*, (1995) су идентификовали THCA синтазу, ензим одговоран за синтезу THCA. Taura *et al.*, (1996) су идентификовали CBDA синтазу, оксидоредуктазу, као ензим одговоран за синтезу CBDA из CBGA, претпостављајући да ниједан коензим или кофактор не учествује у овој конверзији. De Meijer *et al.*, (2002) је описао да се канабиноиди синтетишу у форми киселине, као канабиноидне киселине, које се касније, током складиштења биљног материјала, конвертују у неутралне форме канабиноида. Упркос синтези која је предложена од стране Pate (1994) (Слика 4.2.5.), De Meijer *et al.*, (2002) предлаже биосинтетски пут који почиње од геранилпирфосфата



Слика 4.2.5. Биосинтеза канабиноидних киселина: 1 - канабигерол (CBG); 2 – канабидиол (CBD); 3 - канабихромен (CBC); 4 - делта-9-тетрахидроканабинол (THC) (Pate,1994)

и оливетолинске киселине, дајући CBGA, CBDA и THCA преко CBGA. Sirikantaramas *et al.*, (2004) је нагласио да је THCA синтаза FAD-зависни ензим и каталише оксидативну циклизацију CBGA у THCA. Ова реакција захтева молекулски кисеоник за реоксидацију коензима и производи том приликом водоник-пероксид у моларном односу 1:1 према THCA. У даљем истраживању, Sirikantaramas *et al.*, (2005) је разматрао ове количине насталог пероксида као врло токсичне. Taura *et al.*, (2007) је објавио да је CBDA синтаза ензим одговоран за синтезу CBDA и да је такође FAD-зависни ензим. Према овим истраживањима, разлика у реакцијама THCA синтазе и CBDA синтазе јесте у кораку трансфера протона: CBDA преузима протон са терминалне метил групе CBGA као супстрата, док THCA синтаза уклања протон са хидроксилне групе свог супстрата. У оба случаја, током ових реакција долази до редукције флавина као коензима, У даљем току, редуковани флавин се реактивира формирањем водоник-пероксида, THCA и CBDA синтаза катализују оксидативну циклизацију CBGA у циљу формирања THCA and CBDA, док канабиноиди THC и CBD настају из THCA и CBDA не-ензимском декарбоксилацијом. Предложене реакције синтезе су представљене на слици 4.2.6.

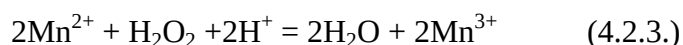
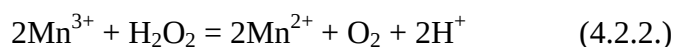


Слика 4.2.6. Биогенеза тетраhydroканабинолне киселине (THCA) и канабидиолне киселине (CBDA) из канабигеролне киселине (CBGA) и декарбоксилација у тетраhydroканабинол (THC) и канабидиол (CBD) (Taura *et al.*, 2007)

Обзиром на то да је водоник-пероксид токсичан, он се даље разлаже на воду и молекулски кисеоник помоћу каталазе која садржи хем групу и диманган центар (Wu *et al.*, 2004). Каталаза користи један молекул H_2O_2 као супстрат који даје електроне, а други молекул H_2O_2 као оксиданс или акцептор електрона (Martin *et al.*, 1989). Сумарна реакција је приказана једначином:



Каталаза која разлаже водоник-пероксид који настаје у реакцији синтезе THCA садржи Mn(III) центар, Истовремено са конверзијом водоник-пероксида у воду, двоатомни кисеоник, Mn(III) се редукује у Mn(II), који се реоксидује из Mn(II) у Mn(III) даљом реакцијом са пероксидом, омогућавајући тако поновну активност флавина као кофактора. Предложене реакције су приказане једначинама 4.2.2. и 4.2.3.:



Исте реакције су предложене и у литератури (Wu *et al.*, 2004). Обе реакције су енергетски фаворизоване, пошто је $\Delta G < 0$ (Radosavljevic-Stevanovic *et al.*, 2014).

Слободна енергија је израчуната према једначини 4.2.4., а на основу вредности редокс потенцијала за одговарајуће полуреакције (једначине 4.2.5, 4.2.6. и 4.2.7.) (Đorđević & Dražić, 1991).

$$\Delta G = - nF\Delta E \quad (4.2.4.)$$

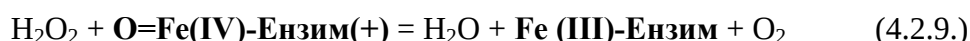
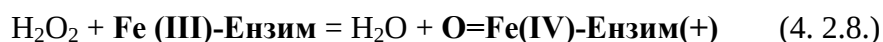
$$E (\text{Mn}^{3+} + e^- = \text{Mn}^{2+}) = +0,62 \text{ V} \quad (4.2.5.)$$

$$E (\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- = 2\text{H}_2\text{O}) = +1,77 \text{ V} \quad (4.2.6.)$$

$$E (\text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^-) = -0,68 \text{ V} \quad (4.2.7.)$$

Позитивна корелација мангана и CBN је очекивана, обзиром на то да је CBN примарни продукт деградације THC.

Негативна корелација Fe и Cr са CBD објашњава се тиме да каталаза одговорна за конверзију пероксида насталог у каталитичкој реакцији CBDA синтазе, има хем групу која садржи гвожђе. Иако комплетни механизам ове каталазе није још увек потврђен, претпоставља се да гвожђе(III) из хем групе везује један молекул водоник-пероксида као супстрат, док се други молекул пероксида понаша као оксиданс или електрон акцептор. Предложени механизам, са прелазним стањем у виду: O=Fe(IV)–Enzyme(+), приказан је једначинама 4.2.8 и 4.2.9. (Boon *et al.*, 2004).



С обзиром на то да је прелазно стање енергетски нестабилно, закључено је да ове реакције вероватно нису фаворизоване (Radosavljevic-Stevanovic *et al.*, 2014).

Иако хром није значајан за раст биљка, негативна корелација хрома према CBD се објашњава међусобно позитивном корелацијом Fe и Cr. Ова два метала се у природи заједно налазе у облику оксида (Filipović & Lipanović, 1985). Сходно томе, очекивана је међусобна позитивна корелација Fe и Cr.

Магнезијум присутан у земљишту је високо мобилан и доступан је биљкама за преузимање. Концентрација овог метала у биљкама је висока, нарочито у лишћу, обзиром на то да је овај метал конституент хлорофила. Негативна корелација овог метала са бакром потиче од чињенице да су њихови јонски радијуси слични, те могу бити равноправни метали у процесима преузимања од стране биљака.

Добијене корелације указују на то да је садржај канабиноида у зависности од садржаја метала у самој биљци и земљишту у коме је биљка била узгајана. Утврђено је да су садржаји CBN и психоактивног THC зависни од садржаја Mn, док је садржај CBD зависан од садржаја Fe (Radosavljevic-Stevanovic *et al.*, 2014).

5. ЗАКЉУЧАК

Резултати испитивања система **земљиште-биоматеријал зуба** применом стереомикроскопије и скенирајуће електронске микроскопије показали су да:

- стајањем у земљишту долази до морфолошких промена површине зубног ткива и оштећења у виду механичких пукотина дентина,
- интензитет промена је пропорционалан временској изложености,
- корозивно дејство земљишта опада у низу: кречњачко>градско>глинено.

Резултати спектроскопске карактеризације биоматеријала применом FTIR показали су да долази до промена органске и неорганске фазе биоматеријала:

- интензитет промена колагена и повећање садржаја органске материје је пропорционалан времену изложености биоматеријала у земљишту и опада у низу: глинено>кречњачко>градско,
- опадање садржаја карбоната у дентину зависи од врсте земљишта и следи низ: глинено>кречњачко>градско,
- промене у изгледу фосфатних трака регистроване су у свим узорцима дентина, независно од врсте земљишта чијем је дејству зуб био изложен.

Наведене промене су показатељ дијагенезе дентина услед дејства земљишта.

Степен кристаличности хидроксиапатита се мења, расте униформно након тромесечног дејства земљишних медијума на зуб, као последица промена само у садржају карбоната. Након шестомесечног дејства земљишних медијума промене у степену кристаличности дентина су различите, услед трансформација фосфата (растварање, хидролиза, копреципитација и др.) које зависе од типа земљишта.

Применом рентгенске дифракције регистрована је промена у кристалности апатита једино на дентину зуба који је био изложен дејству земљишта богатог глином. Овом методом се не добија довољно информација о дијагенези дентина.

Резултати EDS карактеризације минералног ткива зуба су показали:

- на истом долази до адсорпције и десорпције јона метала у интеракцији са окружујућом средином,
- однос Са/Р у дентину се повећава након тромесечног деловања земљишних медијума,
- након шестомесечног дејства земљишних медијума, однос Са/Р има тенденцију опадања у низу: глинено>кречњачко >градско земљиште, услед повећаног уграђивања фосфата.

Свеукупност процеса адсорпције, десорпције, растварања, хидролизе, комплексирања и др. у систему **земљиште – биоматеријал зуба** има за последицу миграцију јона биометала која је утврђена применом технике ICP-OES:

- излуживање јона Cu из структуре зуба,
- веивање јона Ca, Mg и Pb у структуру дентина зуба
- миграција јона Fe и Zn зависи од минералниог састава земљишта, његове киселости и базности оксидо-редукционог стања средине,
- гвожђе се излужује из зуба који су одложени у глиненом земљишту, а везују се за структуру дентина зуба из кречњачког земљишта, које иначе садржи веће количине овог метала,
- цинк се излужује из зуба који су били изложени дејству градског и кречњачког земљишта, а везује се за структуру дентина зуба који је био изложен дејству глиненог земљишта; понашање цинка је у корелацији са садржајем истог у земљишту,
- тенденција промене садржаја гвожђа и цинка зависи од периода изложености зуба утицају појединих врста земљишта.

У случају узорак биоматеријала зуба који су били изложени дејству водених медијума, уочава се тенденција везивања Ca и Mg за биоматеријал, док се остали испитивани метали излужују из узорак зуба у водене медијуме. Наведени процеси су у корелацији са релативно високим садржајем Ca и Mg и ниским садржајем осталих испитиваних метала у коришћеним воденим медијумима.

Резултати испитивања система **земљиште – биометали – биоматеријал биљне врсте *Cannabis sativa*** добијени применом метода AAS и GC-FID, подвргнути хеометријским израчунавањима – Анализи главних компонената (PCA), упућују на постојање корелација садржаја метала у ризосфери и у појединим деловима биљне врсте Cannabis, са једне стране, и садржаја три важна канабиноида у биљци са друге стране:

- садржај канабиноида је у зависности од садржаја метала у биљци и земљишту, независно од врсте земљишта у којој је биљка гајена,
- садржај тетрахидроканабинола (THC) и канабинола (CBN) зависи од садржаја Mn (позитивна корелација),
- садржај канабидиола (CBD) зависи од садржаја Fe (негативна корелација),
- постоји позитивна корелација Fe и Cr,

- постоји негативна корелација Cu и Mg.

На основу свеукупних резултата испитивања промена насталих у систему земљиште – биометали – биоматеријали зуба и биљне врсте *Cannabis sativa* L., закључује се да интеракције ових биоматеријала са земљиштем могу бити потенцијално важне у форензичким испитивањима и то у домену одређивања:

- временске изложености биоматеријала зуба дејству одређене средине,
- врсте земљишта које је интераговао са биоматеријалом зуба,
- одређивању географског порекла биоматеријала биљне врсте *Cannabis sativa*, а на основу корелација метала и органских компонента.

6. CONCLUSION

The results of examination of the system **soil-biomaterial of teeth** by the application of stereo and scanning electron microscopy showed:

- the morphological changes and damage in the form of mechanical cracking of dentin occurred on the teeth surface during its exposure to the soils,
- the intensity of the changes is proportional to the time of exposure,
- the corrosive effect of soils is in sequence: lime>urban>clay soils.

The results of spectroscopic characterization of biomaterials by using the FTIR showed that there is a change in the organic and inorganic phases biomaterial:

- intensity of changes of collagen and increase of the organic matter content is proportional to the time of exposure of biomaterials in the soil and decreases in the series: clay> limestone> city soils,
- decrease in carbonate content in dentin depends on the type of soil and is in a sequence: clay> limestone> city soils,
- changes in the appearance of phosphate bands were registered in all samples of dentin, regardless of the type of soils which was used for teeth exposure.
- these changes are an indication of diagenesis of dentin due to the soils effects.

The degree of crystallinity of hydroxyapatite is changing, increasing uniformly after the three-months of soil effects on the teeth, as a result of changes in the carbonate content. After six months of soil mediums' effects, changes in the degree of crystallinity of dentine are different, due to the transformation of the phosphate (dissolution, hydrolysis, co-precipitation, etc.) that depend on the type of soils.

By using X-ray diffraction, the change of the apatite crystallinity was detected only on teeth dentin which was exposed to clay rich soil. This method does not allow enough information about the dentin diagenesis.

The result of EDS characterization of mineral teeth tissue showed:

- the adsorption and desorption of metal ion happen during the interaction of the teeth tissue with the surround mediums,
- Ca/P ratio in dentin increases after the three months of teeth exposure to the effects of soils mediums,
- after six months of the soil mediums effects, Ca/P ratio tends to decline in a series: clay> limestone> urban soil, due to the increased incorporation of phosphate.

The totality of the adsorption, desorption, decomposition, hydrolysis, complex formation, etc. in the system of **soil – biomaterial of teeth** has resulted in the migration of biometal ions as determined using the ICP-OES:

- leaching of copper ions from the teeth structure,
- binding of ions Ca, Mg and Pb in the structure of the dentin teeth samples,
- migration of Fe and Zn ions depends on mineral composition of soil, its acidity and alkalinity oxido-reducing state of the environment,
- iron is leaching from teeth that are exposed to clay soil, and is binding to the structure of the dentin of the teeth from the limestone soil, which normally contains large amounts of this metal,
- zinc is leaching from the teeth exposed to city and limestone soils, and is binding to the structure of the teeth dentin that was exposed to the effects of clay soil; zinc behavior is correlated with its content in the soil,
- the tendency of iron and zinc contents change depends on the period of teeth exposure to the particular type of soil.

In the case of samples of dental biomaterials exposed to aqueous mediums, there is a tendency to bind Ca and Mg in biomaterial, while the other tested metals leach from dental samples in aqueous mediums. These processes are correlated with a relatively high content of Ca and Mg and low content of other metals in the tested aqueous mediums used.

Results of testing the system **soil - biometals - biomaterial of plant species *Cannabis sativa*** obtained by AAS and GC-FID methods, further subjected to chemometric calculations - principal component analysis (PCA), indicate the existence of correlation between the metal content in the soil around the rhizosphere and in some parts of the plant species Cannabis, on the one side, and the content of three major cannabinoids in the plant on the other:

- the cannabinoids content depends on the content of metals in the soil and the plant, irrespective of the type of soil in which the plant is cultivated,
- the content of tetrahydrocannabinol (THC) и cannabidiol (CBD) depend on the Mn content (positive correlation),
- the cannabidiol content (CBD) depends on the content of Fe (negative correlation),
- there is positive correlation between Fe and Cr,
- there is negative correlation between Cu и Mg.

Based on the overall results of examined changes occurred in the system of **soils - biometals - biomaterials of teeth and plant species *Cannabis sativa* L.**, it is to conclude that the interaction of these biomaterials with the soils may be potentially important in forensic investigations, in the field of determining:

- time of exposure of teeth biomaterials to the effects of specific environment,
- the type of soils that interacted with dental biomaterials,
- the geographical origin of biomaterial of *Cannabis sativa* plant species, based on the correlation between metals and organic components.

7. ЛИТЕРАТУРА

Abdel-Maksoud G., Comparison between the properties of “accelerated - aged” bones and archaeological bones, *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 10:1(2009) 89-112.

Ahamed M., Siddiqui M.K.J., Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions, *Clinica Chimica Acta* 383 (1) (2007) 57-64.

Amr A., Helal F.A., Analysis of trace elements in teeth by ICP-MS: Implication for caries, *Journal of Physics Science*, 21 (2) (2010) 1-12.

Anderson M., Toxicity and Tolerance of Manganese and Iron Vascular Plants. A Literature Review, University of Lund, Lund (1987).

Anđelković H.D., Anđelković D.T., Nikolić S.R., Purenović M.M., Blagojević D.S., Bojić Lj.A., Ristić M.M., Leaching of Chromium containing soil-speciation study and geochemical modeling, *Journal of Serbian Chemical Society* 76(0) (2011) 1-18.

Anđić J., Osnovi oralne fiziologije i biohemije, Naučna knjiga, Beograd (1990).

Antunes A., de Rossi W., Zezell D.M., Spectroscopic alterations on enamel and dentin after nanosecond Nd:YAG laser irradiation, *Spectrochimica Acta Part A* 64 (2006) 1142–1146.

Arru L., Rognoni S., Baroncini M., Medeghini Bonatti P., Perata P., Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica* 140 (2004) 33–38.

Baker P.B., Fowler R., Bagon K.R., Gough T.A., Determination of the distribution of cannabinoids in cannabis resin using high-performance liquid chromatography, *Journal of Analytical Toxicology* 4 (1980) 145–152.

Baker P.B., Gough T.A., Taylor B.J., Illicity imported cannabis products: some physical and chemical features indicative of their origin, *Bulletin Narcotics United Nations Publications XXXII*, New York (1980) 31-40.

Bartlett R.J., James B., Behaviour of chromium in soils III oxidation. *Journal of Environmental Quality* 8 (1979) 31.

Bergdahl I.A., Vahter M., Counter S.A., Lead in plasma and whole blood from lead-exposed Children, *Environmental Research* 80 (1999) 25–33.

Bergslien E.T., Bush M., Bush P.J., Identification of cremains using X-ray diffraction spectroscopy and comparison to trace element analysis, *Forensic Science International*, 175 (2008) 218-226.

Bersenyi A., Fekete S.G.Y., Szócs Z., Berta E., Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb and Hg) on haematology and serum biochemistry in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica* 51(2003) 297–304.

Bertassoni L.E., Orgel J.P.R., Antipova O., Swain M.V., The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale, *Acta Biomaterialia* 8(7) (2012) 2419–2433.

Bodek I., Lyman W., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., *Environmental Inorganic Chemistry*, Pergamon Press, New York (1988).

Boon E.M., Downs A., Marcey D., Proposed Mechanism of Catalase, Catalase: H_2O_2 : H_2O_2 Oxidoreductase: Catalase Structural Tutorial. Retrieved 2007-02-11. Available from:<http://biology.kenyon.edu/BMB/Chime/catalase/frames/cattx.htm#Proposed%20Mechanism%20of%20Catalase>.

Bouquet J.R., Cannabis. *Bulletin of Narcotics*, United Nations Publication II, New York (1950) 14–30.

Bradman A., Eskenazi B., Sutton P., Athanasoulis M., Goldman L.R., Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments, *Environmental Health Perspective* 109 (2001) 1079–84.

Brooks K., Mertens J., Smolders E., Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: a comparative study, *Environmental Toxicol Chemistry* 24 (2005) 101–107.

Brooks T.R., Bodkin T.E., potts G.E., Smullen S.A., Elemental analyses of human cremains using ICP-OES to classify legitimate and contaminated cremains, *Journal of Forensic Science* 51 (2006) 967-973.

Brown G., The structures and chemistry of soil clay minerals, *The Chemistry of Soil Constituents*, John Wiley&Sons Ltd (1998).

Brozek-Mucha Z., Jankowicz A., Evaluation of the possibility of differentiation between various types of ammunition by means of GSR examination with SEM–EDX method, *Forensic Science International* 123 (2001) 39-47.

Carlisle E.M., McKeague J.A., Siever R., van Soest P.J., *Silicon in Geochemistry and Environment*, Hoops (1974).

Castro W., Hoogewerff J., Latkoczy C., Almirall J., Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for elemental analysis of bone and teeth samples for discrimination purposes, *Forensic Science International* 195 (2010) 17-27.

Cazalbou S., Eichert D., Crouet C., Combes C., Rey C., Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium, C.R. Palevol 3 (2004) 563-572.

Causin V., Marega C., Schiavone S., Marigo A., A quantitative differentiation method for acrylic fibers by Infrared Spectroscopy, Forensic Science International 151 (2005) 125-131.

Cengiz S., Karaca A.C., Çakır İ., Üner H.B., Sevindik A., SEM–EDS analysis and discrimination of forensic soil, Forensic Science International 141:1 (2004) 33-37.

Choi J.W., Kim S.K., Association between blood lead concentrations and body iron status in children. Archives in Diseases in Childhood 88 (2003) 791–2.

Christoffersen J., Christoffersen M.R., Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite. V. The acidity constant for the hydrogen phosphate surface complex, Journal of Cryst Growth 57 (1982) 21-26.

Chuang M.C., Shu G.Y., Liu J.C., Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH, Water Air Soil Pollution 90 (1996) 543–556.

Cinino C., Aquilera M., Caiozzi M., Peirano P., Borie F., Martin J.P., Metal binding organic macromolecules in soils, Soils Science 128 (1979) 257.

Clemens S., Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, Planta 212: (2001) 229-248.

Coffman C.B., Gentner W.A., Cannabinoid profile and elemental uptake of *Cannabis sativa* L. as influenced by soil characteristics, Agronomy Journal 67 (1975) 491-497.

Cox R.J., Peterson H.L., Cusik N.S., Espinoza E.O., The forensic analysis of soil organic by FTIR, Forensic Science International 108 (2000) 107-116.

Crichton R.R., Biological Inorganic Chemistry An Introduction, Elsevier (2008).

Darchuk L.A., Zaverbna L.V., Worobiec A., Van Grieken R., Molecular Spectroscopy Study of Human Tooth Tissues Affected by High Dose of External Ionizing Radiation (Caused by Nuclear Catastrophe of Chernobyl Plant), Current Topics in Ionizing Radiation Research, Dr. Mitsuru Neno (Ed.), ISBN: 978-953-51-0196-3 (2012) <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-ionizing-radiation-research/molecular-spectroscopy-study-of-human-tooth-tissues-affected-by-high-dose-of-external-ionizing-radia>.

De Meijer E.P.M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.M.C., Ranalli P., Mandolino G., The inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa* L. Genetics 163 (2002) 335-346.

Djozan D., Baheri T., Karimian G., Shahidi M., Forensic discrimination of blue ballpoint pen inks based on thin layer chromatography and image analysis, *Forensic Science International* 179 (2008) 199–20.

Dobrzanski B., Zawadzki S., *Gleboznawstwo Praca zbirowa*, PWRiL, Warszawa (1993).

Dube A., Zbytniewski R., Kowalkowski T., Curkowska E., Buryewski B., Adsorption and migration of heavy metals in soil, *Polish Journal of Environmental Studies* 10 (2001) 1-10.

Dufey V., Dujourdy L., Besacier F., Chaudron H., A quick and automated method for profiling heroin samples for tactical intelligence purposes, *Forensic Science International* 169 (2007) 108–117.

Dujourdy L., Besacier F., Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes, *Forensic Science International* 179 (2008) 111–122.

Dorđević S., Dobroslovački J., Pešić D., Gogala A., Marinković M., Pavićević K.V., Mik A., Ribnikar S., Jakovljević-Halai N., Antič-Jovanović A., Jeremić M., Rogulić M., Draganić Z., Zumbov K., Hajduković G., Cvjetičanin D., Cvjetičanin N., *Fizičko-hemijske metode*, Rad (1985).

Dorđević Đ.S., Dražić V., *Fizička hemija*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd (2000).

Eboh L.O., Thomas B.E., Analyses of Heavy Metal Content in Cannabis Leaf and Seed Cultivated in Southern Part of Nigeria, *Pakistan Journal of Nutrition* 4 (5) (2005) 349-351.

El-Bassam N., Poelstra P., Frissel M.J., Chrom and Quecksilber in einem seit 80 Jahren mit städtischen Abwasser Berieselten Boden *Z. Pflanzenernaehr Bodenkd* 3 (1975) 309.

ElSlohly A.M., Slade D., Chemical Constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Sciences* 78 (2005) 539-548.

en.wikipedia.org

European Monitoring Center for Drugs and Drugs Addiction, Annual Report, Lisbon (2010).

Fetterman P.S., Keith E.S., Waller C.W., Guerrero O., Doorenbos N.J., Quimby M.W., Mississippi-grown *Cannabis sativa* L. Preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex and plant parts, *Journal of Pharmaceutical Science* 60 (1971) 1246–1249.

- Filipović I., Lipanović S., Opća i anorganska hemija, Školska knjiga, Zagreb (1985).
- Fischedick T.J., Hazekamp A., Erkelens T., Choi H.Y., Verpoororte R., Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes, *Phytochemistry* 71 (2010) 2058-2073.
- Flora S.J.S., Flora G., Saxena G, Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning, in *Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impacts and Health Effects*, Elsevier (2006) 158–228.
- Godo G.H., Reisenauer H.M., Plants effects on soils manganese availability, *Soils Science Society of America Journal* 44 (1980) 993.
- Goyer R.A., Bingham E., Cohrssen B., Powell C.H., *Patty's Toxicology*, Wiley&Sons (2001).
- Greger M., *Metal Availability, Uptake, Transport and Accumulation in Plants. Heavy Metal Stress in Plants from Biomolecules to Ecosystems: Metal Availability, Uptake, Transport and Accumulation in Plants*, Heidelberg: Springer-Verlag (2004).
- Greene E.F., Tauch S., Webb E., Amarasiriwardena D., Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) for the identification of potential diagenesis and crystallinity changes in teeth, *Microchemical Journal* 76 (2004) 141–149.
- Griffin R.A., Au A.K., Frost R.R. Effect of pH on adsorption of chromium from landfill leachate by clay minerals. *Journal of Environmental Science and Health* 12a (1977) 431.
- Grlic L., ST/SOA/SER.S No. 10, United Nations Secretariat document (1954) www.unodc.org.
- Gubala J.W., Identification of thermally changed fibres, *Forensic Science International* 85 (1997) 51-63.
- Gurer-Orhan H., Sabir H.U., Ozgunes H., Correlation between clinical indicator of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead exposed workers, *Toxicology* 195 (2004) 147–54.
- Halpern M.J., *Magnesium Physiopathology. I. Normal Physiology and Biochemistry*. In: *Magnesium deficiency*. Halpern M.J & J. Durlach, Basel (1985).
- Haney A., Kutscheid B.B., Quantitative variation in chemical constituents of marijuana from stands of naturalized *Cannabis sativa* L. in east central Illinois, *Advances in Hemp Research*, Taylor & Francis (1973).

He L.Z., Yang X.E., Stoffella P.J., Trace amounts in agrosystems and impacts on the environment, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19 (2005) 125-140.

Hilling W.K., Mahlberg G.P., A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae), *American Journal of Botany* 91(6) (2004) 966-975.

Hodgson J.F., Geering H.R., Norvell W.A., Micronutrient cation complexes in soil solution, *Soil Science of America Proceedings* 1 29 (1965) 665.

Hogan G.R., Adams D.P., Lead-induced leukocytosis in female mice, *Archives of Toxicology* 41 (1979) 295–300.

Home J.M., Dudley R.J., Thin-layer chromatography of dyes extracted from cellulosic fibers, *Forensic Science International* 17(1) (1981) 71-78.

Hughes M., Lepp N., Phipps D.A., Aerial heavy metal pollution and terrestrial ecosystems, *Advanced Ecology Research*, 11 (1980) 217.

<http://www.tehnologijahrane.com/analizahrane/osnovni-principi-atomske-apsorpcione-spektrofotometrije>

Ige O.O., Umoru L.E., Aribo S., Natural Products: A Minefield of Biomaterials. *Materials Science*, <http://dx.doi.org/10.5402/2012/983062>, (2012).

Jain N.B., Laden F., Guller U., Shanker A., Kazani S., Garshick E., Relation between blood lead levels and childhood anemia in India, *American Journal of Epidemiology* 161 (2005) 968–73.

Jakovljević M., Pantović M., Hemija zemljišta i voda. Naučna knjiga, Beograd (1991).

João A.D., Melki J.A.D., Martin C.C.S., Zerbini T., Scanning electron microscopy as an auxiliary method in the study of exhumed bones, *Forensic Science International* e67-e70.
Jarosinska D., Peddada S., Rogan J., Assessment of lead exposure and associated health risk factors in urban children in Silesia, Poland *Environmental Research* 95 (2004) 133–42.

Jenkins G.N., The physiology and biochemistry of the mouth. Blackwell Scientific publication, (1978).

Jenkins R., Snyder R.L., Introduction to X-ray Powder Diffractometry, John Wiley & Sons, New York (1996).

Jenne E.A., Trace elements sorption by sediments and soil-sites and processes. *Molibdenum in the Environment*, Marcel Dekker (1977).

Jovanović J., Praćenje efekata hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb, Cu) i protektivne uloge suplemenata S-donor liganada preko aktivnosti endonukleaza i

sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, Doktorska disertacija, Prirodno matematički-fakultet, Niš, 2012.

Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B., Trace Elements from Soil to Human, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin (2007).

Kabata-Pendias A., Pendias H., Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press (2000).

Kabata-Pendias A., Krakowiak A., Useful phytoindicator (dandelion) for trace element pollution. Proceedings 5th International Conference of Transport, Fate Effects of Silver in the Environment, Madison WI 145 (1998).

Kaiser H.F., Education and Psychological Measurement 20(1) (1960) 141–151.

Kaličanin., Zubi, dentalni materijali i teški metali, Zaduzbina Andrejevic, Beograd (2006).

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Potentiometric stripping analysis of zinc and copper in human teeth and dental materials, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 22(2) (2008) 93-99.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Copper release from dental prosthetic crowns, dental materials and human teeth into acetic acid, Connective Tissue Research, 51 (2010) 31-35.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Application of potentiometric stripping analysis to determine traces of M(II) metals (Cu, Zn, Pb and Cd) in bioinorganic and similar materials, Wide spectra of quality control, (Ed.) Akyr I., InTech, InTech (2011).

Kannan S., Goetz-Neunhoeffler F., Neubauer J., Ferreira J.M.F., Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate mixtures: structural analysis by Rietveld refinement, Journal of American Ceramics Society 91 (2008) 1–12.

Kaneshima H., Mori M., Mizuno N., Studies on *Cannabis* in Hokkaido (Part 6), The dependence of *Cannabis* plants on iron nutrition, *Hokaidoritsu Eisei Kenkyusho* 23 (1973) 3-5.

Kelada S.N., Shelton E., Kaufmann R.B., Khoury M.J., δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review, American Journal of Epidemiology 154 (2001) 1.

Keller C., Some microscopic and mineral particles of biological origin and soil solution, European Journal of Soil Science 48 (1997) 193–199.

Khan M.A., Wajid A., Noor S., Khattak F.K., Akhter S., Rahman I.U., Effect of Soil Contamination on Some Heavy Metals Content of *Cannabis sativa*, Journal of Chemical Society of Pakistan 30(6) (2008) 805-809.

Kinney J.H., Pople J.A., Marshall G.W., Marshall S.J., Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study, *Calcified Tissue International* 69 (2001) 31–37.

Kostić I., Anđelković T., Nikolić R., Bojić A., Purenović M., Blagojević S., Anđelković D., Copper (II) and lead (II) complexation by humic acid and humic acid-like ligands, *Journal of Serbian Chemical Society* 76(9) (2011) 1325-1336.

Kovačević N., *Osnovi farmakognozije*, Srpska školska knjiga 2002.

Kugler W., X-ray diffraction analysis in the forensic science: the last resort in many criminal cases, *International Centre for Diffraction Data, Advances in X-ray Analysis, JCPDS* 46 (2003).

Lal R., *Encyclopedia of Soil Science*, Taylor&Francis (2006).

Latta R.P., Eaton B.J., Seasonal fluctuations in cannabinoid content of Kansas marijuana, *Economic botany* 29 (1975) 153-163.

Laxen D.P.H., Trace metal absorption/coprecipitation on hydrous ferric oxide under realistic condition, *Water Research* 19 (1985) 1229.

Lech T., Lachowicz T., Application of ICP-OES to multielemental analysis of biological material in forensic inorganic toxicology, *Problems of Forensic Sciences LXXVII* (2009) 64-78.

Leggett R.W., An age specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environmental, Health Perspective* 101 (1993) 598–616.

Lee B.D., Carter B.J., Basta N.T., Weaver B., Factors influencing heavy metal distribution in six Oklahoma benchmark soils. *Soils Science Society of America Journal* 61(1997) 218.

Linde A., Robins S.P., Quantitative assessment of collagen crosslinks in dissected predentin and dentin. *Collagene Related Research* 8 (1988) 443–450.

Lindon C.J., Tranter E.G., Holmes L.J., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 1-3, Elsevier (2000).

Lindsen W.I., *Chemical Equilibria in Soils*. Wiley-Interscience, New York (1979).

Linger P., Müssing J., Fischer H., Kobert J., Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fiber quality and phytoremediation potential, *Industrial Crops Production* 16 (2002) 33-42.

Liu J.H., Wen-Fa Lin L.L., Fitzgerald M.P., Sazena S.C., Shieh Y.N., Possible characterization of samples of *Sannabis sativa* L. by carbon isotopic distributions, *Journal of Forensic Sciences* 24 (1979) 814-816.

Lociciro S., Hayoz P., Esseiva P., Dujourdy L., Besacier F., Margot P., Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland: Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method, *Forensic Science International* 167 (2007) 220-228.

Martinović Ž., *Osnovi dentalne morfologije*, Službeni glasnik, Beograd (2000).

Matsunaga K., Inamori H., Murata H., Theoretical trend of ion exchange ability with divalent cations in hydroxyapatite, *Physical Review B* 78 (2008) 094101-094108.

Mahaffey K., Mc Kinney J., Reigart J.R., *Lead and compounds, Environmental toxicants, human exposure and their health effects*, John Wiley and Sons, New York (2000).

Mansouri M.T., Cauli O., Motor alterations induced by chronic lead exposure. *Environmental Toxicological Pharmacology* 27 (2009) 307–13.

Manuals, Guidelines and Publications, Drugs Testing Laboratories, UNODC http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/publications_manuals.html.

Martin D.W., Meyers A.P., Rodwell W.K., Granner K.D., *Harperov pregled biohemije*, Savremena administracija, Beograd (1989).

Matsunaga K., Inamori H., Murata H., Theoretical trend of ion exchange ability with divalent cations in hydroxyapatite, *Physical Review B* 78 (2008) 094101-8.

Меденица М., Малешев Д., Ескпериментална физичка хемија,. Академија штампарија, Београд (2002).

Mengel K., Kirkiby A.E., *Principles of Plant Nutrition*, International Potash Institute, 11 (1987) 427.

Meyers A.M., Chen P.Y., Lin A.Y. M., Seki Y., *Biological materials: Sturcture and mechanical propreties*, *Progress in Material Science* 53 (2008) 1-206.

Mikesen L.R., *Aregional newsletter*, Potash&Phosphate Institute of Canada (2006).

Miller R.G., Bowles C.Q., Eick J.D., Gutshall P.L., Auger electron spectroscopy of dentine: elemental quantification and the effects of electron and ion bombardment, *Dental Materials*, 9 (1993) 280–5.

Милосављевић С., *Структурне инструменталне методе хемијске анализе*, Хемијски факултет, Београд (1998).

Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press (2011).

Momčilović B., *The copper group. Elements and their compounds in the environment*, VCH, Weinheim (2004).

Morgan H., Wilson R.M., Elliott J.C., Dowker S.E.P., Anderson P., *Preparation and*

characterization of monoclinic hydroxyapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate, *Biomaterials* 21 (2000) 617–27.

Morse, J.W., Arvidson, R.S., The dissolution kinetics of major sedimentary carbonate minerals, *Earth Science Reviews* 58 (2002) 51–84.

Munno D. G., Geday M.A., Medaglia M., Anastassopoulou J., Theophanides T., Manganese and cobalt cytosine (Cyt) and 1-methycytosine (1-Mecyt) complexes, *Metal ions in biology and medicine*, Libbey Eurotext (1996).

Murata M., Akazawa T., Mitsugi M., Um I., Kim K.W., Kim Y.K., Human Dentin as Novel Biomaterial for Bone Regeneration, *Materials Science, Biomaterials, Biomaterials - Physics and Chemistry* (2011).

Nahas G., Symposium on Marijuana., *Bulletin of Narcotics*, United Nations Publication XXX (1978) 23–32.

Nakamoto K., *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, Part A and B., John Wiley and Sons Inc, New York (2009).

Nikolić R., Kalićanin B., Copper Release from Dental Prosthetic Crowns, *Dental Materials*, and Human Teeth into Acetic Acid. *Connective Tissue Research* 51(1) (2010) 31-35.

Nikolić R., Kalićanin B., Krstić N., The release of zink, copper, lead, and cadmium from the mineral tissue of teeth under the influence of soft drinks and sour-tasting food, *Connective Tissue Research* 53(3) (2012) 229-235.

Nikolić R.S, Jovanović J.M, Krstić N.S, Kocić G.M., Cvetković T.P, Radosavljević-Stevanović N., Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione, *Toxicology and Industrial Health*, January 4, 2013, 1-8, doi: 10.1177/0748233712469652.

Одређивање тетрахидроканабинола у биљци *Cannabis sativa* и њеним производима семи-квантитативном методом танкослојне хроматографије, Ц-01-(03,04,05)/01-03-22, Национални криминалистичко-технички центар, Министарство унутрашњих послова, Београд (2013).

Pacha J., Kedziorska M., Krupna G., Orzel M., Polanska J., Schikora G., Activity of selected enzymes in soil subjected to the action of trivalent chromium compounds. *Acta Biologica Silesiana* 9 (1988) 38.

Pansu M., Gautheyrou J., *Handbook of Soil Analysis*, Mineralogical, Organic and Inorganic Methods, Springer-Verlag, Berlin (2006).

Pasteris J.D., Wopenkaa B., Freemana J. J., Rogersb K., Valsami-Jonesc E., J. A.M. van der Houwenc, M. J. Silvad, Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials, *Biomaterials* 25 (2004) 229–238.

Patonai Z., Maasz G., Avar P., Schmidt J., Lorand T., Bajnoczky I., Mark L., Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes, *International Journal of Legal Medicine* 127 (2013) 529–533.

Patte D.W., Chemical Ecology of Cannabis, *Journal of International Hemp Association* 2:29 (1994) 32-37.

Pédro G., Caractérisation générale des processus de l'altération hydrolytique, *Base des anadem géochimique et thermodynamique, Science Du Soles* 2 (1979) 93–105.

Peters C.A., Comparative Elemental Analysis of Firearms Projectile Lead by ICP-OES, *FBI Laboratory Chemistry Unit* (2002).

Piga G., Solinas G., Thompson T.J.U., Brunetti A., Malgosa A., Enzo S., Is X-ray diffraction able to distinguish between animal and human bones, *Journal of Archaeological Science* 40 (2013) 778-785.

Piomelli S., Lead poisoning. *Hematology of Infancy and Childhood*, WB Saunders (1998).

Pitts J.E., Neal J.D., Gough T.A., Some features of cannabis plants grown in the United Kingdom from seeds of known origin, *Journal of Pharmacy and Pharmacolgy* 44(1992) 947–951.

Porter A.E., Nalla R.K., Minor A., Jinschek J.R., Kisielowski C., Radmilovic V., Kinney J.H., Tomsia A.P., Ritchie R.O., A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin, *Biomaterials* 26 (2005) 7650-7660.

Prieto-Castelló M.J., Hernández del Rincón J.P., Pérez-Sirvent C., Álvarez-Jiménez P., Pérez-Cárceles M.D., Osuna E., Luna A., Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval, *Forensic Science International* 172 (2007) 112-118.

Razic S., Đogo S., Slavkovic L., Inorganic analysis of herbal drugs. Part II. Plant and soil analysis-divrse bioavailability and uptake of of eessential and toxic elements, *Journal of Serbian Chemical Society* 71 (10) (2006) 1095-1105.

Razic S., Djogo S., Slavkovic L., Multivariate characterization of herbal drugs and rizosphere soil samples according to their metallic content, *Microchemical Journal* 84 (2006) 93-101.

Razic S., Onija A., Đogo S., Slavkovic L., Popović A., Determination of metal content in some herbal drugs-Empirical and chemometric approach, *Talanta* 67 (2005) 233-239.

R.C.M. Police Crime Detection Laboratory, Atomic Absorption Spectroscopy in Forensic Chemistry, *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 7 (1974) 1.

Recommended Methods for Identification and Analyses of Cannabis and Cannabis Products, United Nations Office on Drugs and Crime, New York (2009).

Sanders J.R., Bloomfield C., The influence of pH, ionic strength and reactant concentrations on copper complexing by humified organic matter. *Journal of Soil Science* 31 (1980) 53.

Saraymen R., Soylak M., Narin I., Serum cadmium levels of people living in Kayseri-Belsin Region-Türkiye. *Fresenius Environment Bulletin* 7 (1998) 403–5.

Shibuya E.K., Sarkis J.E.S., Negri-Neto O., Martinelli L.A., Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of Sao Paulo (Brazil), *Forensic Science International* 167 (2007) 8-15.

Schroder H.A., Balassa J.J., Tipton I.H., Abnormal Trace metals in man: chromium. *Journal of Chronic Disease*. 15 (1962) 961.

Schulten H.R., *Naturwiss* 78 (1991) 311.

Schwertman U., Taylor R.M., Iron oxides in Minerals in Soil Environments, *Soils Science Society of America* 145 (1977).

Sherma J., Forensic Ink Analysis by TLC, *Encyclopedia of Chromatography*, DOI: 10.1081/E-ECHR-120044850 (2008).

Shibuya E.K., Sarkis J.E.S., Negri-Neto O., Moreira M.Z., Victoria R.L., Sourcing Brazilian Marijuana by Applying IRMS Analysis to Seized Samples, *Forensic Science International* 160 (2006) 35-43.

Shiels M.E., Shike M., Ross C.A., Caballero B., Cousins R.J., Magnesium. In: Rude RK, *Modern nutrition in health and disease*, Williams & Wilkins (2005).

Shinomya T., Shinomya K., Orimoto C., Minami T., Tohno Y., Yamada M., In- and out-flow of elements in bones embedded in reference soils, *Forensic Science International*, 98 (1998) 109-118.

Sholkovitz E.R., Copland D., The coagulation, solubility and adsorption properties Fe, Mn, Cu, Ni, Cd, Co and humic acids in the river water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45 (1981) 181.

Selvaraju R., Thiruppath G., Raman R.G., Dhakshanamoorthy D., Estimation of essential and trace elements in the medicinal plant *tribulus terrestris* by ICP-OES and flame photometric techniques, Romanian. Journal of Biology – Plant Biology 56:1 (2011) 65–75.

Sirikantaramas S., Morimoto S., Shoyama Y., Ishikawa Y., Wada Y., Taura F., The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L., Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 39767–39774.

Sirikantaramas S., Taura F., Tanaka Y., Ishikawa Y., Morimoto S., Shoyama Y., Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of glandular trichomes. Plant Cell Physiology 46(9) (2005) 1578-1528.

Soares L.E.S., Santo A.M.d.E., Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments of dentin components, part 2: energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study, Journal of Biomedical Optics, 14(2) (2009) 024002.

Sparks L.D., Environmental Soil Chemistry, Academic Press Elsevier Science (2003).

Spears D.A., The origin of tonsteins, an overview, and links with seatearths, fireclays and fragmental clay rocks, Spears, International Journal of Coal Geology 94(2012) 22-31.

Stefanidou M., Dona A., Athanaselis S., Papoutsis I., Koutselinis A., The cannabinoid content of marihuana samples seized in Greece and its forensic aplication, Forensic Science International 95 (1998) 153–162.

Sugiyama S., Matsumoto H., Hayashi H., Moffat J.B., Sorption and ion-exchange properties of brium hydroxyapatite with divalent cations, Colloidal Surface A. 169 (2000) 17-26.

Sugiyama S., Ichii T., Matsumoto H., Hayashi H., Effect of calcination and sieving of calcium hydroxyapatite on ion-exchangeability with lead cation in the presence and absence of HCl, Advanced Environment Research 6 (2002) 285-289.

Optimisation and harmonisation of the profiling method, Forensic Science International 167 (2007) 220–228.

Outerbridge W.F., The Pennsylvanian Fire Clay tonstein of the Appalachian basin-Its distribution, biostratigraphy and mineralogy: Discussion and reply, Geological Society American Bulletin 108(1) (1996) 120-125.

Radosavljevic-Stevanovic N., Markovic J., Agatonovic-Kustrin S., Razic S., Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids: a chemometric approach to the

analysis of Cannabis sativa samples, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters (2014) DOI: 10.1080/14786419.2014.880912.

Стратегија за борбу против дрога у Републици Србији за период од 2009 до 2013, Влада Републике Србије, Службени гласник РС бр. 55/05, 71/05-исправка, 101/07 и 65/08 (2009).

SWG Drug Recommendations, <http://www.swgdrug.org>.

Taura F., Morimoto S., Shoyama Y., First direct evidence for mechanism of delta-1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis, Journal of American Chemical Society 38(1995) 9766-9767.

Taura F., Morimoto S., Shoyama Y., Purification and characterization of cannabinolic acid synthase from *Cannabis Sativa* L., Journal of Biological Chemistry 271 (1996) 17411-17416.

Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Yoshikakai K., Shoyama Y., Morimoto S., Cannabinolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*, FEBS Letters 581(2007) 2927-2934.

Taura F., Sirikantarmas S., Shoyama Y., Shoyama Y., Morimoto S., Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. Chemical Biodiversity 4 (2007) 1649-1663.

Taylor B.J., Neal J.D., Gough T.A., The physical and chemical features of cannabis plants grown in the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland from seeds of known origin – Part III: third and fourth generation studies, Bulletin of Narcotics, United Nations Publication XXXVII, New York (1985) 75–81.

Trueman N.G.C., Behrensmeyer K.A., Turnoss N., Weiner S., Minerological and compositional changes in bones exposed to soil surface in Amboseli National park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids, Journal of Archaeological Science 3 (2004) 721-739.

Turner M.A., Rust R.H., Effect of chromium on growth and mineral nutrition of soyabeans. Soils Science Society of America Proceedings 35 (1971) 755.

Recommended Methods for Identification and Analyses of Cannabis and Cannabis Products, United Nations Office on Drugs and Crime, New York (2009).

Vass A.A., Bass W.M., Wolt J., Ammons J., Time since death determination of human cadavers using soil solution, Journal of Forensic Sciences 37(1992) 1236-1253.

Vochten R.C., Geyes J.G., Pyrite and calcite in separation concentrations from the Rupelian clayat Ramast (Belgium) and their geochemical composition. *Chemical Geology* 14 (1974) 69.

Yasukawa A., Yokoyama T., Kandory K., Ishikawa T., Ion-exchange of magnesium-calcium hydroxyapatite solid solution particles with Cd^{2+} ion, *Colloids and Surfaces A* 317 (2008) 123-128.

Yoshino M., Kimijuma T., Miyasaka S., Sato H., Seta S., Microscopical study on estimation of the time of since death in skeletal remains, *Forensic Science International* 49(2) (1991) 143-158.

Watanabe H., Kurahashi M., Kojima L., Honda K., Fukumoto N., Non-destructive determination of manganese state in rice leaf by X-ray absorption spectrometry. *Soil Science Plants Nutrients* 36 (1990) 149.

Weber J.H., Binding and transport of metals and hmic materials: Humic Substances and Their Role in the Environment, Wiley and Sons, New York (1988).

Wells A.F., Ionic Radius of Divalent Copper, *Nature* 157 (1946) 192-193.

Williams D.F., Definition in Biomaterials. Elsevier, Amsterdam (1987).

Wopenkia B., Pasteris J.D., A mineralogical perspective of apatite in bone, *Material Science Engineering C*, 25 (2005) 131-143.

Wright R.O., Shannon M.W., Wright R.J., Hu H., Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic, *American Journal of Public Health* 89 (1999) 1049–53.

www.springer.com

Wu L., Forsling W., Schindler P.W., Surface complexation of calcium minerals in aqueous solution. 1. Surface protonation at fluorapatite-water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 147 (1991) 178-185.

Zimdahl R., Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources, 6th Annual Meeting of thr Air Pollution Control Association, Boston, 1975.

Zyrin N.C., Rerich W.I., Tikhomirov F.A., Forms of zinc compounds in soils and its supply to plants. *Agrohimyia* 5 (1976) 124.

Наташа В. Радосављевић-Стевановић
-биографија-

Рођена је 16.10.1972. године у Нишу, где је завршила основну школу и Гимназију *Светозар Марковић*, смер природно-математички. Године 1998. завршила је Филозофски факултет (данас Природно-математички), на смеру хемија са просечном оценом у току студија 8,48. За израду и одбрану дипломског рада на тему *Кинетичко испитивање витамина Б6* оцењена је највишом оценом. На истом факултету је 2003. године уписала магистарске студије на Катедри за општу и неорганску хемију. Школске 2007/08 уписује докторске студије на Природно-математичком факултету у Нишу, Одсеку хемија. Године 2010. на истом факултету је изабрана у звање истарживача приправника.

Од 2011. године учествује као истраживач на пројекту под називом Криминалистичко-форензичка обрада места кривичног догођаја на Криминалистичко-полцијској академији у Београду.

У периоду од 1999. до 2000. године радила је у Електронској индустрији-*Штампана кола*, на радном месту инжењера хемије у процесном инжењерингу. Радом на овим пословима стекла је потврду о стручној оспособљености за обављање послова у звању дипломирани хемичар.

Након тога, у периоду од 2001. до 2005. године, ради на месту професора хемије у Гимназији *Светозар Марковић* у Нишу.

У рад Лабораторије за геохемију Природно-математичког факултета у Нишу укључује се 2003. године радећи на пословима истраживача, када се између осталог, ангажује и на планирању и имплементацији пројекта из области заштите животне средине и промовисања здравља становништва.

Године 2005. започиње рад у Министарству унутрашњих послова Републике Србије, Дирекцији полиције, Управи криминалистичке полиције, Националном криминалистичко-техничком центру, Одсеку у Нишу на пословима физичко-хемијских вештачења. Од 2010. године ради у централној лабораторији за физичко-хемијска вештачења Националног криминалистичко-техничког центра у Београду.

До данас је била учесник већег број стручних скупова у организацији: ОЕБС-а, Националног криминалистичког истраживачког института у Норвешкој, Националног форензичког института у Прагу, Европске мреже форензичких института (ЕНФСИ), Еуропола, Министрства одбране САД, УН - Канцеларије за борбу против наркотика и

организованог криминала и ФБИ у области експертиза наркотика и различитих врста микротрагова као предмета кривичних дела, као и поступања у случајевима акцидентних ситуација.

У периоду од 2010. до 2013. године ради на планирању и имплементацији пројеката из Програма ИПА прекограничне сарадње Бугарска-Србије и Мађарска-Србија у својству координатора пројекта, док у 2014. започиње имплементацију пројекта из Програма норвешке билатералне помоћи у својству менаџера пројекта.

Године 2012. и 2013. похађа семинаре о увођењу стандарда ISO/IEC 17025 у лабораторије МУП. Тренутно ради на имплементацији захтева поменутог стандарда у области вештачења наркотика у свим форензичким лабораторијама МУП Р. Србије.

Представник је Националног криминалистичко-техничког центра МУП Р. Србије у Радним групама ЕНФСИ за наркотике и влакна тканина и члан Управног одбора Радне групе за наркотике ЕНФСИ.

Члан је Српског хемијског друштва (од 2004. године) и Друштва физико-хемичара Србије (од 2003. године).

Живи и ради у Београду. Удата је и мајка једног детета.

Наташа В. Радосављевић-Стевановић
-библиографија-

Рад у часопису категорије М₂₂:

1. Ružica S Nikolić, Jasmina M Jovanović, Nenad S Krstić, Gordana M Kocić, Tatjana P Cvetković, **Nataša Radosavljević-Stevanović**, *Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione*, Toxicology and Industrial Health (2013) doi:10.1177/0748233712469652.

Рад у часопису категорије М₂₃:

1. **Radosavljevic-Stevanovic N.**, Markovic J., Agatonovic-Kustrin S., Razic S., *Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids: a chemometric approach to the analysis of Cannabis sativa samples*, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters (2014) DOI: 10.1080/14786419.2014.880912.
2. R. S. Nikolić, **N.V. Radosavljević-Stevanović**, T. D. Anđelković, M. N. Stanković, N. S. Krstić, *The migration of some biometal ions in the system mineral tissue of teeth-soil and teeth-water mediums*, J. Serb. Chem. Soc. (2014) doi: 10.2298/JSC140207058N.

Рад презентован на међународном скупу штампан у целини категорији М₃₃:

1. **N. V. Radosavljević-Stevanović**, R. S. Nikolić, N. S. Krstić, B. M. Kalićanin, *SEM-EDS analysis of the system biomineral tissue – natural mediums in the forensic examination*, Proceedings of the 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade – Serbia, September 24–28, 2012, 612-614.

2. **Nataša V. Radosavljević-Stevanović**, Ružica S. Nikolić, Nenad S. Krstić, *The application of the instrumental methods: ICP-OES and SEM-EDS in forensic analyses of teeth mineral tissue*, Proceedings of the International Scientific Conference „Archibald Reiss Days“, 1-2 March 2012, Belgrade, Serbia, Vol. II 972-975.

Рад презентован на међународном скупу штампан у изводу категорије М₃₄:

1. Ružica S. Nikolić, Nenad S. Krstić, Maja N. Stanković, Jasmina M. Jovanović, **Nataša V. Radosavljević-Stevanović**, *FTIR analysis the effect of heavy metals poisoning on mineral tissues*, Book of abstract, 49th Meeting of the Serbian Chemical Society, May 13-14, 2011, Kragujevac, Serbia.
2. Agatonovic-Kustrin S., Razic S., **Radosavljevic-Stevanovic** N., Morton D., A chemometrics approach to the analysis of Cannabis sativa samples. Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids, 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 13-16 April 2014, Melbourne Australia.

Стручни радови публиковани у домаћим часописима

1. **Н. Радосављевић-Стевановић**, Форензички методи испитивања заплена хероина, "Право и форензика у криминалистици", Зборник радова, 430-437, Крагујевац 2009.
2. **Н. Радосављевић-Стевановић**, Инструменталне методе идентификације дизајнера опојних дрога, "Право и форензика у криминалистици", Зборник радова, 337-344, Крагујевац 2010.
3. И. Бјеловук, Т. Кесић и **Н. Радосављевић-Стевановић**, Акредитација форензичких лабораторија, стање и перспективе у Србији, "Криминалистичко-форензичка обрада места кривичног догађаја", Зборник радова, 159-172, Криминалистичко-полцијска академија, Београд 2013.

Стручни радови публиковани у међународним часописима

1. **N.Radosavljević-Stevanović**, Forenzički metodi ispitivanja vlakana, 2. Kongres sudskih vještaka sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, 455-463, Opatija 2010.
2. **N.Radosavljević-Stevanović**, Савремени материјали као дизајнери опојних дрога, Научно-стручни скуп са међународним учешћем "Савремени материјали", Академија наука и умјетности Републике Српске, Зборник радова, 381-389, Бања Лука 2011.

Излагања по позиву презентована на стручним скуповима Европске мреже форензичких института – ЕНФСИ

1. **N.Radosavljevic-Stevanovic**, M.Jovanovic, N.Radulovic, Profiling of *Cannabis Sativa* Samples from Different Seizures on the Area of the Southern Serbia, 2010, Bled. ENFSI DWG Annual Meeting.
2. **N.Radosavljevic-Stevanovic**, S.Gajic, Case Study of the Illicit Laboratory for Synthetic Drug Production, 2011, Ankara. ENFSI DWG Annual Meeting.
3. **N. Radosavljevic/Stevanovic**, S.Razic, Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids, 2014, Helsinki. ENFSI DWG Annual Meeting.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Нови форензички аспекти примене резултата анализе система:

земљиште-биометали-биоматеријали

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 09.06.2014.

Аутор дисертације:
Наташа Радосављевић-Стевановић

Потпис докторанда:



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Наташа Радосављевић-Стевановић

Студијски програм: докторске студије

Наслов рада: Нови форензички аспекти примене резултата анализе система: земљиште-биометали-биоматеријали

Ментор: Проф. др. Ружица Николић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 09.06.2014.

Аутор дисертације:
Наташа Радосављевић-Стевановић

Потпис докторанда:

N. Radosavljevic-Stevanovic



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Нови форензички аспекти примене резултата анализе система
земљиште - биометали - биометријали
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 09.06.2014.

Аутор дисертације: Наташа Радосављевић-Стевановић

Потпис докторанда: