

Indigo - sinteza i primjena

Vučetić, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:324363>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Lovro Vučetić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Indigo – sinteza i primjena

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Zagreb, 2023. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Fizikalna svojstva indiga	2
1.2. Kemijska svojstva indiga.....	6
§ 2. SINTEZA INDIGA	9
2.1. Kemijske sinteze indiga	9
2.1.1. Baeyer-Emmerlingova sinteza	9
2.1.2. Baeyer-Drewsonova sinteza.....	11
2.1.3. Heumannove sinteze.....	12
2.1.4. Heumann-Pflegerova sinteza	14
2.1.5. "One-pot" sinteza.....	15
2.2. Biotehnološke sinteze indiga	18
2.2.1. Oksigenaze bez hemske skupine.....	19
2.2.2. Hemske oksigenaze	21
2.2.3. Flavin-ovisne monooksigenaze	21
§ 3. PRIMJENA INDIGA	23
§ 4. ZAKLJUČAK	26
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XXVII

§ Sažetak

Indigo, jedno od najpoznatijih bojila, modro je bojilo koje se koristi već tisućama godina. Prije otkrića strukture dobivao se ekstrakcijom i obradom spoja indikana iz biljaka roda *Indigofera*. Otkrićem strukture 1883. počele su prve kemijske sinteze indiga zahvaljujući Adolfu von Baeyeru. Modifikacija Heumannove metode sinteze indiga iz polaznog anilina i kloroctene kiseline omogućila je dobivanje indiga na industrijskoj skali i njegovu komercijalnu upotrebu. Dodatno pojednostavljenje postupka pripreme indiga postignuto je tzv. “one-pot” sintezom koja se temelji na katalitičkoj oksidaciji lako dostupnog indola te njegovoj dimerizaciji u indigo. Budući da kemikalije korištene u postupku industrijskog dobivanja indiga uglavnom nisu ekološki prihvatljive, proučavaju se mikrobne biotehnološke metode pripreme indiga koje zahtijevaju dodatna istraživanja kako bi bile efikasnije i primjenjive na industrijskoj skali. Glavna primjena indiga je u tekstilnoj industriji gdje služi kao bojilo koje daje prepoznatljivu plavu boju traperica.

§ 1. UVOD

Boja je vidni osjet koji je ovisan o frekvenciji elektromagnetskog zračenja. Raspon valnih duljina elektromagnetskih valova koje ljudsko oko može zapaziti naziva se vidljivo zračenje i seže od najkraće valne duljine ljubičaste boje (380 nm) do najduže valne duljine crvene boje (760 nm). Vizualna percepcija određene boje započinje tako da zračenje određene valne duljine pobudi na različite načine fotoreceptorske stanice u mrežnici oka. Postoje dvije vrste fotoreceptorskih stanica povezanih živcima s mozgom: štapići (pomažu u osjetu svjetline) i čunjići (služe za raspoznavanje boja). Prijenosom informacija između tih receptora i mozga dolazi do interpretacije promatrane boje.¹

Bojila su tvari koje se koriste za bojenje raznih materijala poput tekstila, kože, papira, krzna, plastike, farmaceutskih preparata i sl. Za razliku od boja i lakova, koji se nanose u tankom sloju na površinu materijala, bojila ulaze u strukturu materijala pri čemu mogu tvoriti: a) kemijske veze ili privlačne međumolekulske interakcije sa spojevima prisutnim u materijalu i b) netopljive spojeve unutar samog materijala. Obojeni organski spojevi u strukturi svojih molekula sadrže kromofore, karakteristične nezasićene funkcijske skupine (primjerice nitro-, nitrozo-, azo- i karbonilna skupina), koje su obično povezane s aromatskim jezgrama u rezonancijski stabilizirane konjugirane sustave.²

Boje su neizostavan dio naših svakodnevnih života te imaju značajan utjecaj na naše emocije, ponašanje i percepciju svijeta oko nas. Povijest korištenja bojila jako je bogata i duga, ljudi su od davnina koristili prirodna bojila dobivena iz listova (indigo) i korijenja (kurkumin) biljaka, puževa (antikni purpur) ili insekata (karmin)⁴ u svrhu bojenja tekstila. Primjer navedenog je arheološko otkriće 30 000 godina starih lanenih tkanina obojenih u žutu, crvenu, plavu, ljubičastu, smeđu i zelenu boju u špilji Dzudzuana u današnjoj Gruziji.³

Indigo je važno prirodno bojilo koje se može dobiti iz biljaka koje rastu diljem svijeta, od tropskih mahunarki roda *Indigofera* (*Indigofera tinctoria*, *Indigofera anil* i dr.) koje rastu u Aziji do modrog vrbovnika (*Isatis tinctoria*) koji pretežito raste u sjevernoj Europi. Indigoidna bojila predstavljaju jednu od najstarijih poznatih klasa organskih bojila, prije 5000 godina koristila su se za bojenje tekstila poput pamuka, vune i lana u Indiji, Kini i Egiptu. Jedan od primjera takvih indigoidnih bojila je antikni purpur, kojeg većim dijelom čini spoj 6,6'-

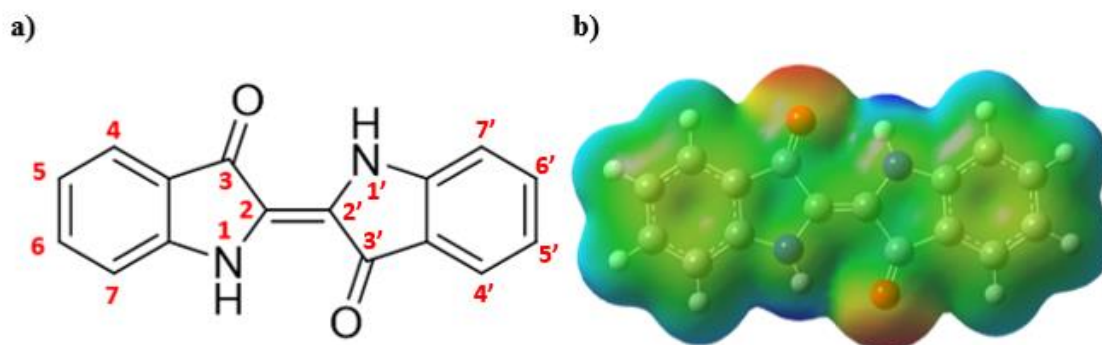
dibromindigo. Za razliku od indiga dobivao se od puževa, bodljikavih volaka (*Murex brandaris*) kao crveni purpur ili od kvrgavih volaka (*Murex trunculus*) kao plavi purpur, a upotrebljavao se kao pigment za dobivanje slikarskih boja. Do varijacije u boji antiknog purpura u različitim vrstama puževa dolazi zbog različitih udjela 6,6'-dibromindiga, indiga i 6-bromindiga.⁴

Cilj ovog rada je prikazati svojstva i razne načine sinteze indiga te njegovu primjenu u svakodnevnom životu.

1.1. Fizikalna svojstva indiga

Sustavno ime indiga, spoja molekulske formule $C_{16}H_{10}O_2N_2$ znanog i kao indigotin, je 2,2'-bis(2,3-dihidro-3-oksoindoliliden).⁵ Struktura molekule sastoji se od dvije indolne jezgre međusobno povezane ugljik-ugljik dvostrukom vezom između položajua 2 i 2' i supstituirane na položajima 3 i 3' karbonilnim skupinama (slika 1a.). Indol je heterociklički spoj sastavljen od benzenskog i pirolnog prstena.⁶ Pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku indigo je u obliku plavo-ljubičastih kristalnih iglica crveno-brončanog metalnog sjaja. Iznad 170 °C sublimira tvoreći crveno-ljubičaste pare koje hlađenjem kondenziraju tvoreći tamnoljubičate kristale. Talište indiga iznosi 390-392 °C.¹³

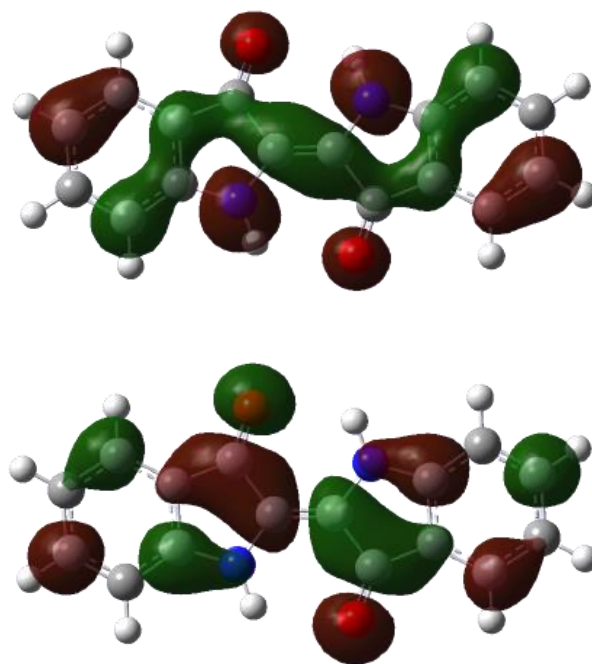
Indigo je nepolarna molekula, sadržava centralnu os simetrije gdje su polarne veze N-H i C=O orijentirane jedna nasuprot drugoj te se stoga dipolni momenti obiju veza međusobno poništavaju. Optimiziranu strukturu indiga autor rada samostalno je napravio u programu GaussView 6.0 koristeći Hartree-Fock/3-21G metodu te je izračunat molekulski elektrostatski potencijal (slika 1b). Dobiveni rezultati pokazuju dobro slaganje s literaturnim podacima dobivenim u istom programu.⁷



Slika 1. a) Strukturna formula molekule indiga. b) Molekulski elektrostatski potencijal na izoplohi elektronske gustoće indiga

Područja veće elektronske gustoće i parcijalno negativnog naboja prikazana su crvenom bojom, područja manje elektronske gustoće i parcijalno pozitivnog naboja prikazana su plavom bojom, područja između veće i manje elektronske gustoće prikazana su žutom, zelenom, odnosno svijetloplavom bojom. Iz slike 1b. vidljivo je kako se područje najveće elektronske gustoće nalazi oko atoma kisika karbonilnih skupina, dok se područje najmanje elektronske gustoće nalazi oko atoma vodika vezanih za atom dušika. Radi svoje nepolarnosti indigo praktički nije topljiv u vodi, razrijeđenim kiselinama i lužinama, a slabo je topljiv u polarnim otapalima visokog vrelišta kao što su anilin, fenol, nitrobenzen, anhidrid ftalne kiseline i dimetil-sulfoksid. Razlog loše topljivosti i visokog tališta može se pripisati intra- i intermolekulskim vodikovim vezama koje stvaraju karbonilna i amino-skupina.⁷ Također, prema strukturi bi se moglo očekivati postojanje *cis*- i *trans*-izomera oko centralne C=C dvostruke veze, no postoji jedino *trans*-izomer radi ranije spomenute stabilizacije intra- i intermolekulskim vodikovim vezama.

Nastanak boje u organskim molekulama opisan je teorijom molekularskih orbitala. Nastajanje molekularskih orbitala tumači postupak poznat kao linearna kombinacija atomskih orbitala (LCAO, engl. *linear combination of atomic orbitals*) pri čemu se orbitala smatra područjem visoke vjerojatnosti nalaženja elektrona u prostoru. Kombinacijom orbitala ugljikovog atoma nastaju hibridne atomske orbitale čijim izravnim preklapanjem nastaju molekulske σ -orbitale koje mogu biti vezne, niže energije te ih okupira par elektrona u osnovnom stanju molekule, te neokupirane protuvezne (σ^*) koje su više energije. Bočnim preklapanjem nehibridiziranih ugljikovih p atomskih orbitala nastaju molekulske π -orbitale. Bojila su organske molekule koje sadrže konjugirani sustav σ - i π -veza. Elektronski prijelaz najniže energije dogodi se kada je elektron pobuđen kvantom elektromagnetskog zračenja iz najviše zauzete π molekulske orbitale (HOMO) u najnižu nezauzetu π^* molekulsku orbitalu. Za razliku od energijski zahtjevnijih σ - σ^* prijelaza elektrona, π - π^* prijelazi su zaslužni za apsorpciju u UV i vidljivom djelu spektra elektromagnetskog zračenja većine organskih bojila i pigmenata.¹⁰ Prikaz HOMO i LUMO orbitala indiga autor rada samostalno je napravio u programu GaussView 6.0 optimizacijom geometrije koristeći razinu teorije B3LYP/6-31G (slika 2.). Dobiveni rezultati pokazuju dobro slaganje s literaturnim podacima dobivenim u istom programu.⁷



Slika 2. Prikaz molekularskih orbitala HOMO (gore) i LUMO (dolje) molekule indiga

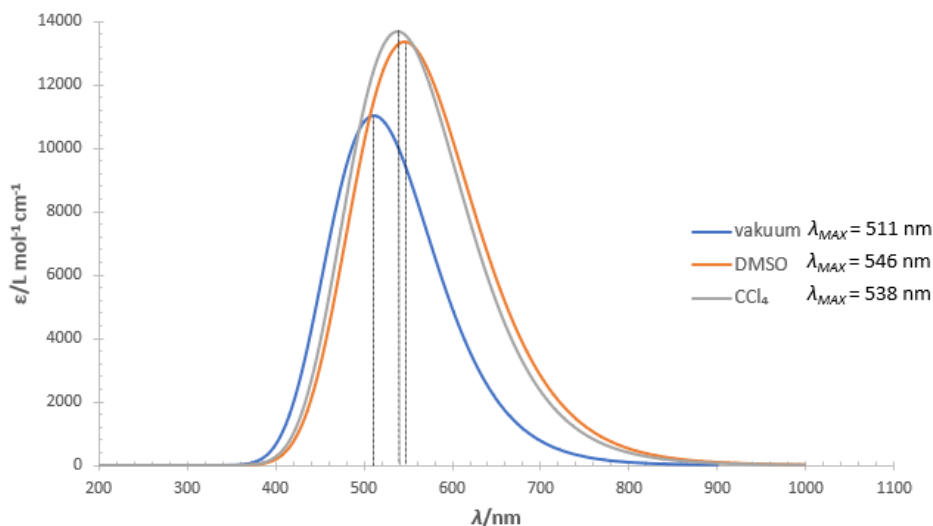
Energija HOMO iznosi -5,3797 eV, a energija LUMO iznosi -2,9581 eV, te razlika u energiji HOMO-LUMO iznosi $\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} = 2,4216 \text{ eV} = 3,8798 \times 10^{-19} \text{ J}$. Iz Planckove jednadžbe može se izračunati valna duljina zračenja potrebnog za prijelaz HOMO-LUMO:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

$$\lambda = h \cdot \frac{c}{E} = 6,6261 \times 10^{-34} \text{ J s} \cdot \frac{3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}}{3,8798 \times 10^{-19} \text{ J}} = 511 \text{ nm}$$

gdje je E energija fotona, ν frekvencija odgovarajućeg elektromagnetskog zračenja, h Planckova konstanta, a λ valna duljina zračenja.

Koristeći vremenski ovisnu teoriju funkcionala gustoće (TD-DFT) i razinu teorije B3LYP/6-311G, te metodu polarizabilnog kontinuuma (PCM) autor rada samostalno je napravio optimiziranu strukturu molekule i izračunao UV-Vis spektar indiga u vakuumu i u odabranim otapalima (DMSO i kloroform) kako bi se vidio utjecaj otapala na apsorpciju zračenja (slika 3.).



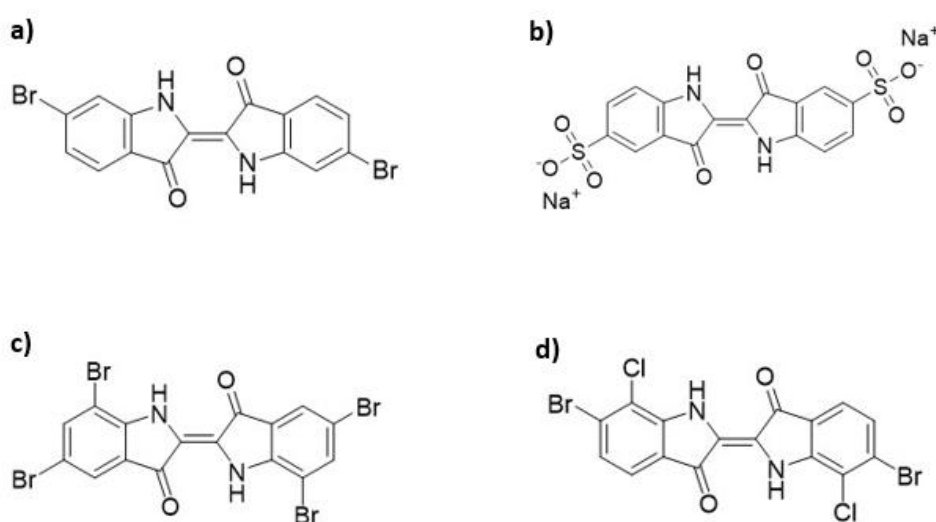
Slika 3. Teorijski UV-Vis spektri indiga

Eksperimentalno određena valna duljina maksimalne apsorpcije indiga u kloroformu iznosi 590 nm, a u DMSO-u iznosi 620 nm,⁸ te su obje vrijednosti nešto veće od računalno izračunatih teorijskih vrijednosti koje iznose 538, odnosno 546 nm. Uzrok lošijeg slaganja vrijednosti vjerojatno je korištenje razine teorije koja zahtijeva manje računalne snage i vremena, no zauzvrat daje manje precizne rezultate. Računalno dobiveni rezultati UV-Vis spektra i oni dobiveni eksperimentalno ukazuju na to da indigo pokazuje svojstvo pozitivnog solvatokromizma, tj. povećanja valne duljine apsorpcije nastale promjenom polarosti otapala.⁹ Iz navedenog se može zaključiti da je pobuđeno stanje polarnije od osnovnog stanja jer ga polarnije otapalo stabilizira dipol-dipol interakcijama i smanjuje energiju potrebnu za pobudu elektrona iz HOMO orbitale u LUMO orbitalu te je zračenje veće valne duljine dovoljno za tu pobudu.

U plinovitoj fazi indigo ima maksimum apsorpcije pri 539 nm, no u ovom stanju indigo je prisutan kao zasebna molekula bez postojećih međumolekulskih interakcija, tj. vodikovih veza. Pošto je apsorbirana valna duljina u području zelene boje, uočena boja bit će komplementarna crvena. U krutom stanju ili u otopini indigo se ponaša kao agregat radi snažnih intermolekulskih interakcija koje su uzrok pomaka apsorpcije prema većim valnim duljinama u apsorpcijskom spektru, tzv. crveni pomak. Što je veći stupanj agregacije to će biti veći crveni pomak, kao krutina bio bi 668 nm, a u otopini od 590-630 nm što bi rezultiralo opažanjem tamnoplave boje.⁸

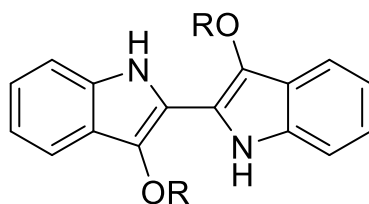
1.2. Kemijska svojstva indiga

Indigo je vrlo otporan na izlaganje svjetlu i povišenoj temperaturi čak i u prisutnosti zraka. Molekula ne podliježe lako nukleofilnoj ili elektrofilnoj susptituciji, već je stabilna s obzirom da sadrži konjugirani π -sustav u kojem je elektronska gustoća ravnomjerno raspoređena u molekuli. Dodatno, intramolekulske i intermolekulske vodikove veze smanjuju reaktivnost funkcijskih skupina podložnih nukleofilnom ili elektrofilnom napadu. Na slici 2. može se opaziti kako vodikovi atomi na ugljicima 6 i 6' ne sudjeluju u nastajanju veznih i protuveznih orbitala, što znači da imaju drugačiju reaktivnost od ostatka molekule. Supstitucijom tih atoma vodika bromom nastaje derivat indiga, bojilo znano kao antikni purpur (6,6'-dibromindigo) čija je strukturna formula prikazana na slici 4. a). Kod LUMO orbitala nema konjugacije sustava radi čvornih ravnina, te atomi vodika na pozicijama ugljika 5, 5', 7 i 7' ne sudjeluju u nastajanju veznih i protuveznih orbitala i susptitucijom tih atoma vodika nastaju derivati indiga. Jedan od derivata je bojilo znano kao indigo karmin (dinatrijeva sol 5,5'-indigosulfonske kiseline) dobiven sulfoniranjem indiga, koji se koristi kao prehrambeno bojilo, u kozmetici, u lijekovima te kao pH indikator (slika 4. b)). Drugi derivat plave boje, 5,7,5',7'-tetrabromindigo, dobiva se bromiranjem indiga u octenoj kiselini (slika 4.c)). Bromiranjem 4,4'-diklorindiga dobije se spoj zeleno-plave nijanse, 5,5'-dibrom-4,4'-diklorindigo, koji se koristio kao boja za printanje (slika 4. d)).^{11,12}



Slika 4. Strukturne formule derivata indiga: a) 6,6'-dibromindigo (antikni purpur); b) dinatrijeva sol 5,5'-indigosulfonske kiseline (indigo karmin.); c) 5,7,5',7'-tetrabromindigo; d) 5,5'-dibrom-4,4'-diklorindigo

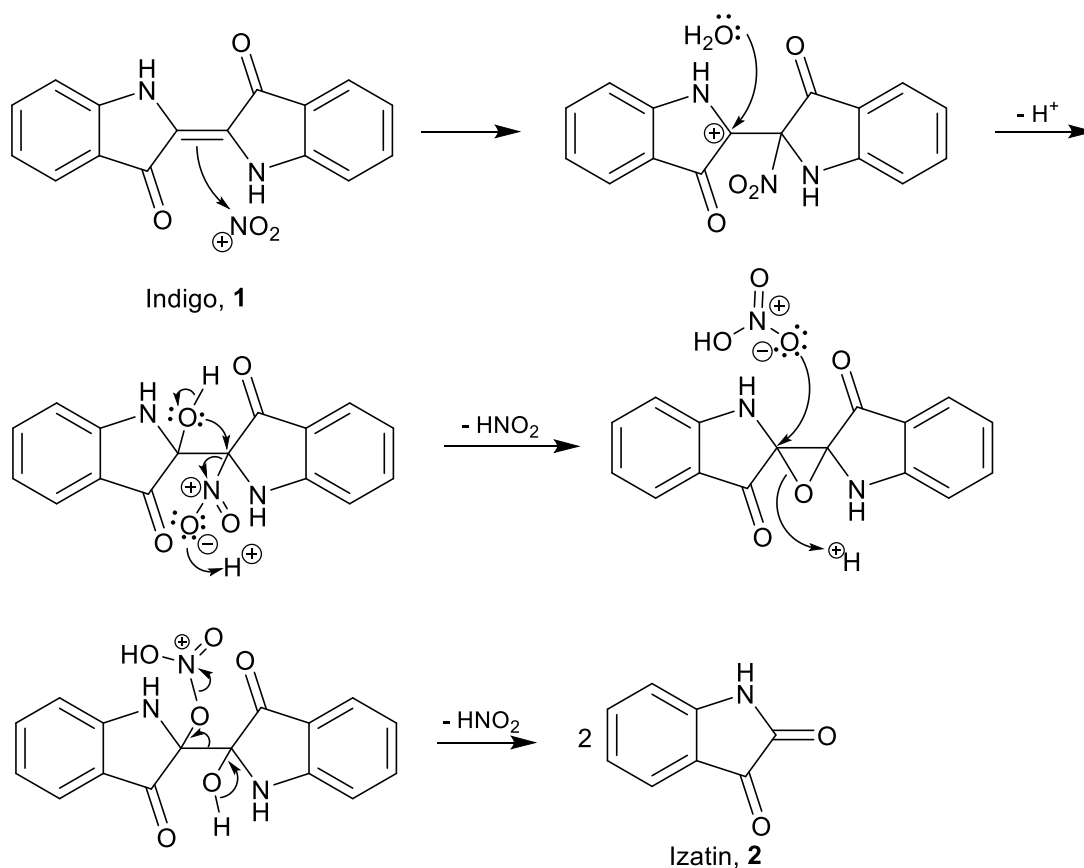
Indigo se lagano reducira raznim redukcijskim sredstvima poput cinka u prahu (Zn), natrijeva ditionita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), vodika (H_2), hidroksiacetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$) ili elektrokemijskim putem, pri čemu nastaje bijeli indigo, leukoindigo (slika 5.), koji se u lužnatom mediju otapa i nastaje dinatrijeva sol leukoindiga žute boje. To svojstvo je bitno jer kada redukcijom nastane bijeli indigo, on se može otopiti u otopini natrijeva hidroksida kako bi nastala dinatrijeva sol leukoindiga koja duboko prodire i ima veliki afinitet za tkaninu, te oksidacijom na zraku ponovno stvara netopljivi plavi indigo fiksiran na vlaknu.



R = H; Leukoindigo, bijeli indigo
R = Na; Dinatrijeva sol leukoindiga

Slika 5. Strukturne formule molekula leukoindiga i dinatrijeve soli leukoindiga

Oksidacijom indiga **1** dušičnom kiselinom nastaje dehidroindigo, a daljnjom oksidacijom uz permanganat, kromat ili dušičnu kiselinu (slika 6.) dolazi do cijepanja središnje dvostruke veze u molekuli i nastanka izatina **2**, žuto-crvenih kristalića topljivih u vrućoj vodi.^{13,14}



Slika 6. Shematski prikaz mehanizma oksidacije indiga do izatina dušičnom kiselinom

U prvom koraku dolazi do elektrofilne adicije nitronijevog iona na dvostruku vezu te zatim do nukleofilnog napada vode na pozitivno nabijeni ugljikov atom, izlaska HNO_2 i nastanka epoksida. Otvaranjem epoksidnog prstena dušičnom kiselinom i prijenosom elektrona dolazi do nastanka izatina **2**.¹⁴

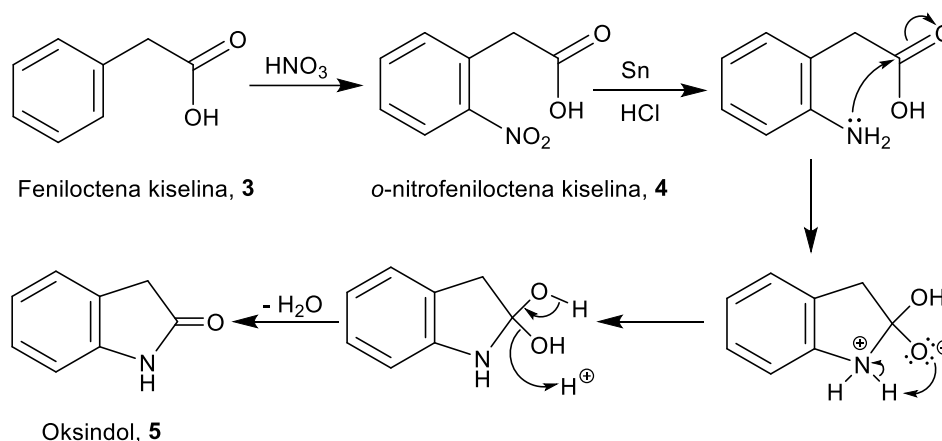
§ 2. SINTEZA INDIGA

Problem kod izolacije prirodnog indiga bili su razni faktori koje ljudi nisu mogli uspješno kontrolirati. Ovisno o vremenu žetve i podrijetlu, biljke iz kojih se indigo izolira sadržavale su različite udjele prekursora indiga, indikana, kao i različite nečistoće koje bi smanjile čistoću indiga, te je zato proizvođač bojila trebao imati puno iskustva u tom području. Zamjena prirodno dobivenog sintetski dobivenim indigom predstavljala je značajan napredak i poticaj u korištenju indiga koji je napokon bio dostupan u visokoj čistoći. Početkom 1870-tih godina potaknuti netom provedenom uspješnom sintezom prirodnog bojila alizarina laboratoriji raznih sveučilišta i kemijske industrije nastojali su otkriti strukturu molekule indiga. Kemičar Adolf von Baeyer identificirao je, osim prethodno poznatih anilina i antranilne kiseline, dodatne produkte razgradnje indiga, indol i izatin, te konačno 1883. otkrio strukturu indiga. Osim što je otkrio strukturu, A. von Baeyer imao je vrlo bitnu ulogu i u sintezi indiga: 1878. uspio je provesti prvu laboratorijsku sintezu indiga. U znak priznanja za njegov doprinos napretku organske kemije i kemijske industrije u području organskih boja i hidroaromatskih spojeva dobio je 1905. Nobelovu nagradu za kemiju.^{15,16}

2.1. Kemijske sinteze indiga

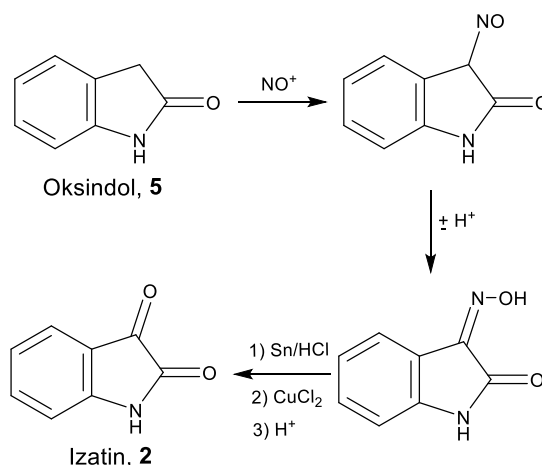
2.1.1. Baeyer-Emmerlingova sinteza

Baeyer i Emmerling sintezu indiga počeli su 1870., a usavršavala se idućih nekoliko godina. S obzirom da oksidacijom indiga nastaje spoj izatin, pokušali su napraviti inverznu reakciju, redukciju izatina. No problem je bio taj što u početnim pokušajima sinteze indiga još nije bila poznata sinteza izatina, pa se koristio izatin dobiven iz samog indiga. Godine 1878. Baeyer je objavio sintezu izatina i njegovog prekursora oksindola i tek tada je mogao provesti totalnu laboratorijsku sintezu indiga.¹⁷ Sinteza oksindola počinje nitriranjem feniloctene kiseline **3** koncentriranom dušičnom kiselinom iz čega se dobije *o*-nitrofeniloctena kiselina **4**, čijom redukcijom uz kositar i klorovodičnu kiselinu dolazi do ciklizacije i nastanka reduciranog međuprodukta oksindola **5** (slika 7.).¹⁸



Slika 7. Shematski prikaz mehanizma sinteze oksindola

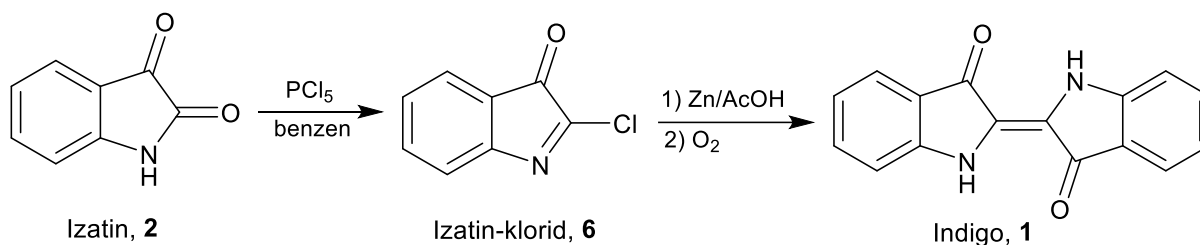
Sintetski koraci u pripravi izatina iz oksindola prikazani su na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz sinteze izatina iz oksindola

Prvi korak je nitrozacija oksindola. Tautomerni enolni oblik oksindola, 2-hidroksiindol, s dvostrukom vezom na poziciji 2 omogućava nukleofilni napad na nitrozil-kation. Protoniranjem kisikovog atoma nitrozilne skupine dolazi do deprotoniranja ugljika na položaju 3 i stvaranja dvostruke veze između tog ugljika i atoma dušika nitrozilne skupine. Daljnjom redukcijom uz Sn/HCl nastaje amino-skupina čijom oksidacijom bakrovim(II) kloridom ionsko-radikalnim mehanizmom ili željezovim(III) kloridom nastaje imin koji se hidrolizira u keto-skupinu dajući izatin i amonijak. Izatin su zatim klorirali korištenjem fosforova triklorida, PCl_3 , uz dodatak acetil-klorida i grijali reakcijsku smjesu pri 75-80 °C nekoliko sati, no prinos te reakcije od 10-20 % nije bio zadovoljavajuć. Osam godina kasnije, 1878., Baeyer je napravio sintetsku modifikaciju te je umjesto korištenja PCl_3 i acetil-klorida koristio fosforov pentaklorid, PCl_5 , i

reakciju provodio u otvorenom sustavu kako bi se nastali plin klorovodik uklanjao iz reakcijske smjese i tako pomaknula ravnoteža prema nastanku produkta. Nastali izatin-klorid **6** reducira se cinkom u prahu u ledenoj octenoj kiselini te se zatim dobiveni međuprodukt oksidira molekulskim kisikom kako bi nastao indigo (slika 9.).¹⁴

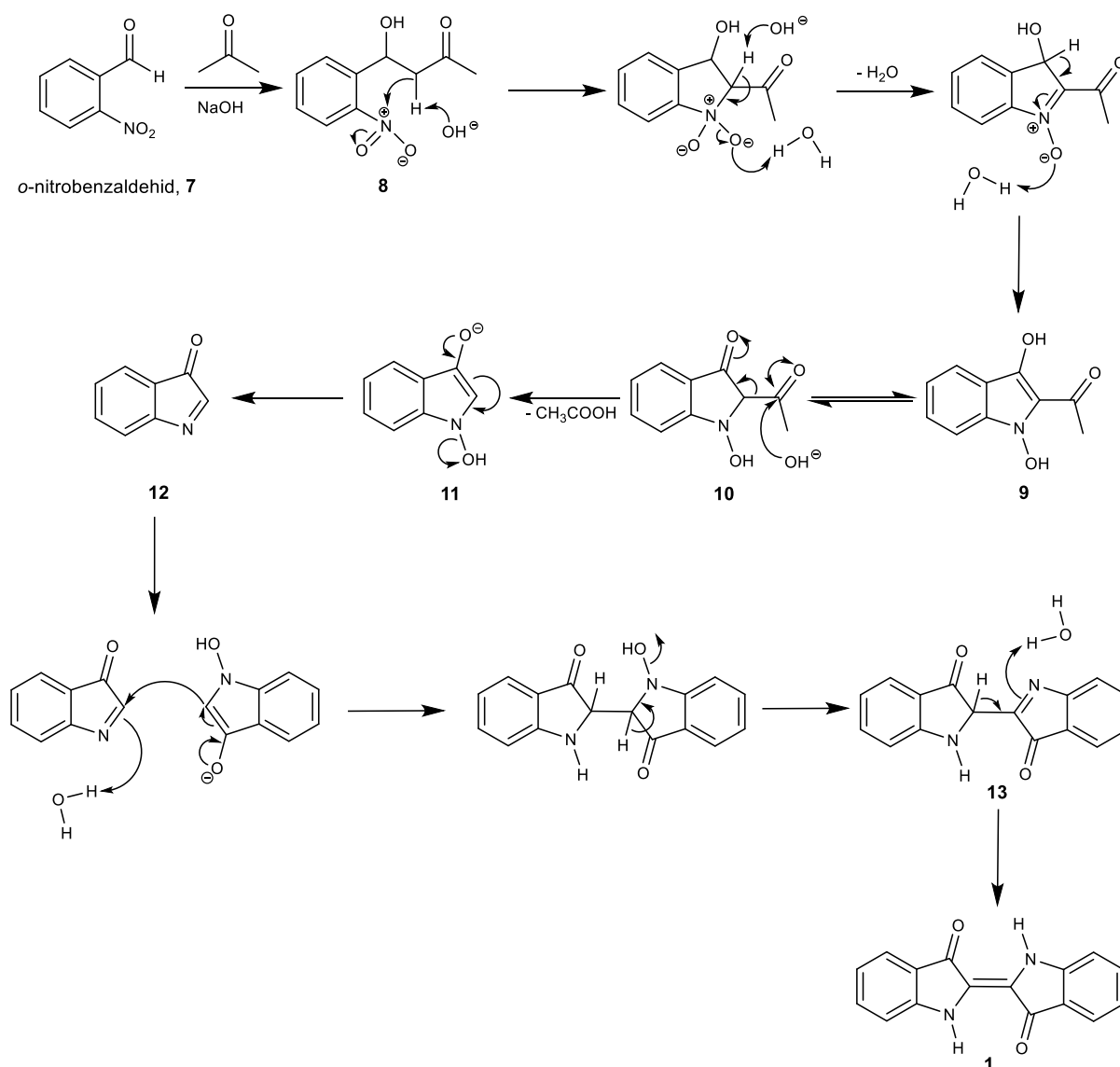


Slika 9. Shematski prikaz sinteze indiga iz izatina

2.1.2. Baeyer-Drewsonova sinteza

Baeyer-Drewsonova sinteza indiga objavljenja 1882. godine¹⁹ jedan je od najjednostavnijih postupaka pripreme indiga. Za reakciju su potrebna samo dva reaktanta, *o*-nitrobenzaldehyd i aceton u lužnatom mediju. Početni spoj, *o*-nitrobenzaldehyd, može se dobiti nitriranjem toluena te oksidacijom 2-nitrotoluena.

Prvi korak mehanizma je bazno katalizirana aldolna kondenzacija. Natrijev hidroksid deprotonira aceton te nastaje enolati ion koji nukleofilno napada karbonilnu skupinu *o*-nitrobenzaldehyda **7** i nastaje aldol **8**. U idućem koraku deprotonira se α -ugljikov atom i slobodni par elektrona nukleofilno napada nitro-skupinu u reakciji intramolekulske ciklizacije. Ponovnim deprotoniranjem α -ugljikovog atoma dolazi do nastanka dvostruke ugljik-dušik veze što omogućava protoniranje jednog od atoma kisika nitro-skupine i izlazak vode. Nakon stvaranja dvostruke veze dolazi do deprotoniranja ugljika na kojem je vezana hidroksilna skupina te nastanka dvostruke veze s α -ugljikovim atomom i pomaka elektrona s dvostruke veze na pozitivno nabijen atom dušika. Keto-enolnom tautomerizacijom spoja **9** nastaje keto-oblik **10**. U slijedećem koraku hidroksidni ion nukleofilno napada karbonilni atom ugljika acetilne skupine izvan prstena i dolazi do izlaska octene kiseline pri čemu nastaje enolat **11**. Pomakom elektrona enolat tvori indolon **12** koji u lužnatoj otopini dimerizira u međuprodukt **13** čijim dehidratiranjem i deprotoniranjem nastaje indigo **1** (slika 10.). Ukupni prinos reakcije iznosi oko 65 %.^{20,21}



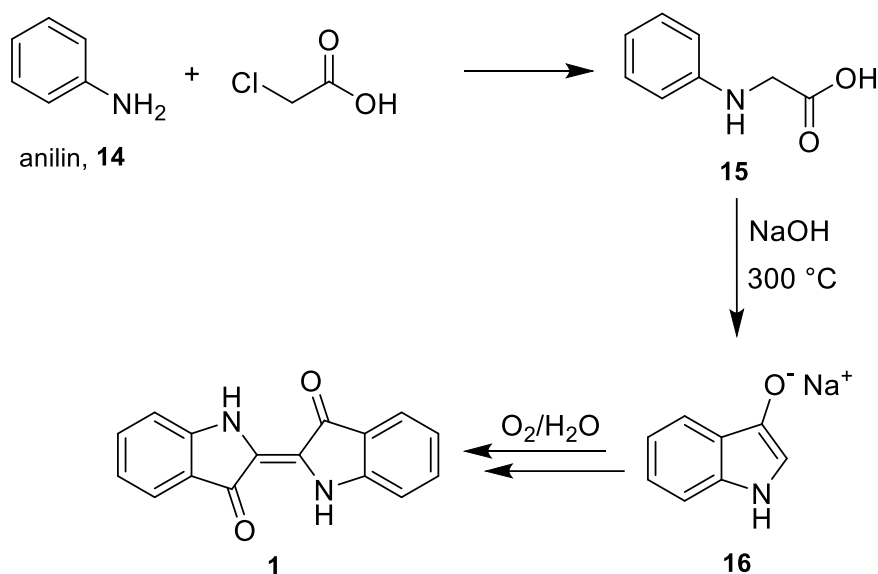
Slika 10. Shematski prikaz mehanizma Baeyer-Drewson sinteze indiga

Sinteze koje uključuju korak nitriranja na industrijskoj skali nisu bile isplative radi nastajanja neželjenih međuprodukata, te opisani postupak nije bio dovoljno selektivan i samim time skup.²¹

2.1.3. Heumannove sinteze

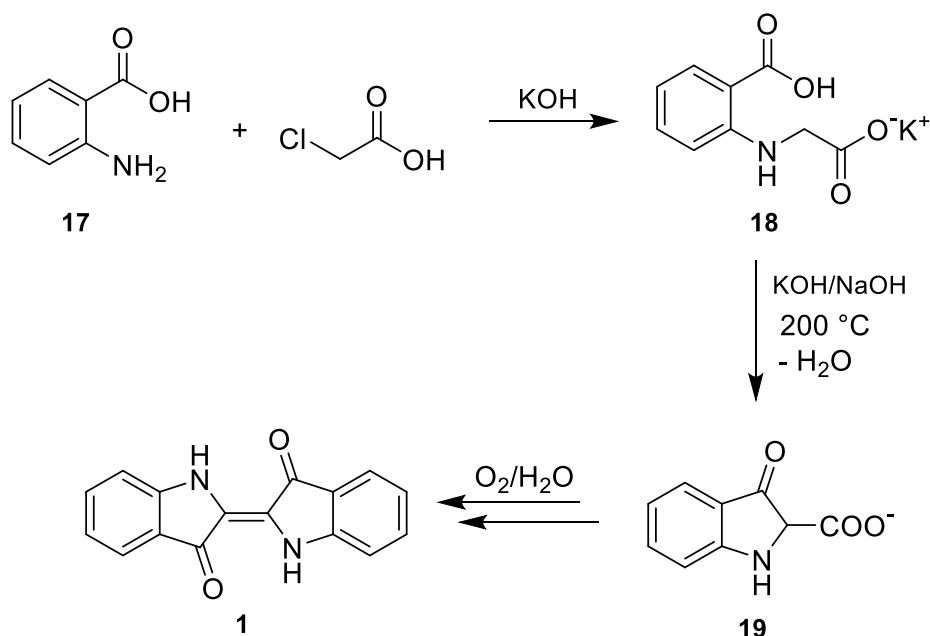
Karl Heumann 1890. godine objavio je novu sintetsku metodu dobivanja indiga koja kao reaktante koristi anilin **14** i kloroctenu kiselinu, a prema njemu se naziva Heumannova metoda I.²² U reakciji nukleofilne supstitucije (S_N2) nukleofil, dušikov atom molekule anilina napada

elektrofilni ugljikov atom kloroctene kiseline te kloridni ion odlazi kao izlazna skupina pri čemu nastaje međuprodukt *N*-fenilglicin **15**. U reakciji s taljenim NaOH pri 300 °C reakcijom zatvaranja prstena iz spoja **15** nastaje indoksilat **16** koji se hidrolizom i oksidacijom s kisikom prevodi u indigo (slika 11.). Radi visoke temperature pri kojoj se reakcija provodila dolazilo je do djelomične razgradnje, te je dobiveni prinos od 10 % bio prenizak za proizvodnju na industrijskoj skali.^{12,13,16}



Slika 11. Shematski prikaz sinteze indiga Heumannovom metodom I

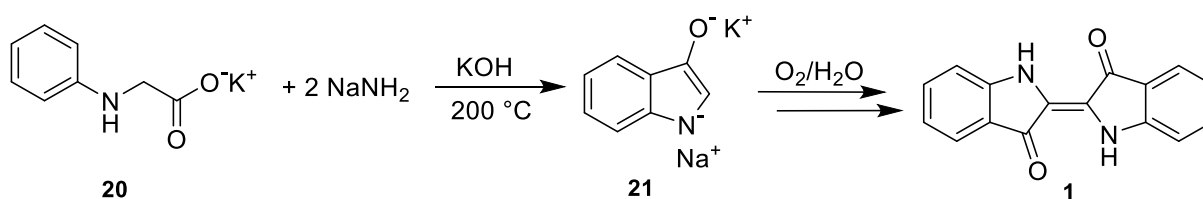
Tri godine kasnije, 1893., Heumann je napravio preinake svoje prethodne metode i objavio drugu metodu u kojoj je anilin zamijenio s 2-aminobenzojevom kiselinom **17**, antranilnom kiselinom. Uvođenjem karboksilne skupine u *ortho*-položaj anilina, u $\text{S}_{\text{N}}2$ reakciji s kloroctenom kiselinom dolazi do lakšeg zatvaranja prstena u usporedbi s prijašnjom metodom. Sol alkalijskog metala *N*-fenilglicin-*o*-karboksilne kiseline **18** dodaje se taljevini NaOH/KOH pri 200 °C pri čemu nastaje sol indoksilkarboksilne kiseline **19** koja se nakon hidrolize i dekarboksilacije oksidira kisikom dajući indigo (slika 12.). Prinos opisane sinteze je 70–90 % i varira ovisno o reakcijskim uvjetima i čistoći dikarboksilne kiseline. Ova metoda znatno je povećala prinos reakcije pripreve indiga u usporedbi s prethodno opisanim postupkom te je prihvaćena za industrijsku proizvodnju koja je započela 1897. od strane BASF (hrv. Badenska tvornica sode i anilina). Također, ova metoda bila je ekonomski prihvatljiva jer se polazna antranilna kiselina mogla jeftino proizvoditi iz naftalena, tada otpadnog proizvoda u postupku obrade katrana.^{12,13,16}



Slika 12. Shematski prikaz sinteze indiga Heumannovom metodom II

2.1.4. Heumann-Pflegerova sinteza

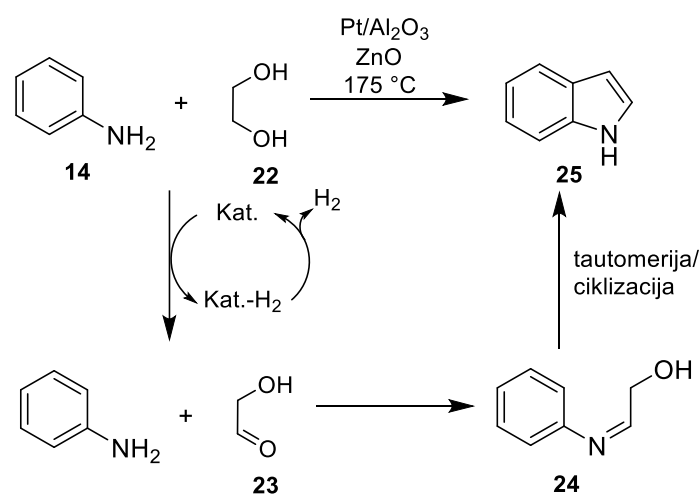
Johannes Pfleger 1901. godine modificirao je Heumannovu prvu metodu koristeći sol *N*-fenilglicina **20**, te dodajući natrijev amid, NaNH₂, u alkalnu talinu. Natrijev amid snažno je dehidratacijsko sredstvo koje pogoduje reakciji zatvaranja prstena kako bi nastao indoksil **21**. Također reagira s viškom vode snizujući temperaturu reakcije s 300 °C do otprilike 200 °C što uzrokuje puno efikasniju provedbu reakcije uz prinos do 90 % (slika 13.). Korištenje relativno jeftinog anilina kao početnog reaktanta i natrijeva amida kao kondenzacijskog sredstva bila su dva ključna faktora za ekonomski uspjeh tvrtke BASF u proizvodnji indiga.^{13,23,24}



Slika 13. Shematski prikaz mehanizma sinteze indiga Heumann-Pflegerovom metodom

2.1.5. "One-pot" sinteza

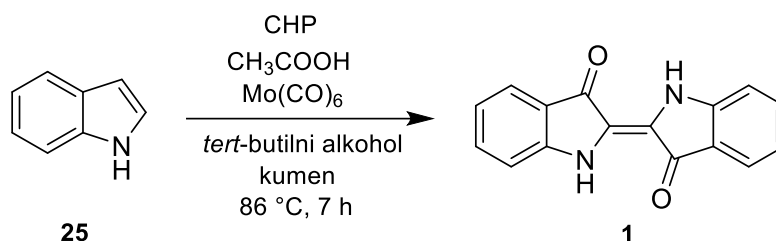
Prethodne sinteze indiga obuhvaćale su više koraka i zahtjevnije reakcijske uvjete. Stoga su provedena istraživanja sa svrhom pronalaska efikasnijeg načina dobivanja indiga koristeći minimalni broj koraka i praktičnije reakcijske uvjete, tzv. "one-pot" sinteza. Reakcija se temelji na oksidaciji indola te dimerizaciji do indiga. Indol se prije dobivao kao frakcija katrana, a sada se proizvodi na industrijskoj skali reakcijom anilina **14** i etilen-glikola **22** u uvjetima heterogene katalize gdje se etilen-glikol dehidrogeniranjem prevodi u 2-hidroksiacetaldehid **23**. Reakcijom spoja **23** s anilinom nastaje iminski međuprodukt **24** iz kojeg tautomerizacijom i ciklizacijom nastaje indol **25** (slika 14.).²⁵



Slika 14. Shematski prikaz sinteze indola²⁵

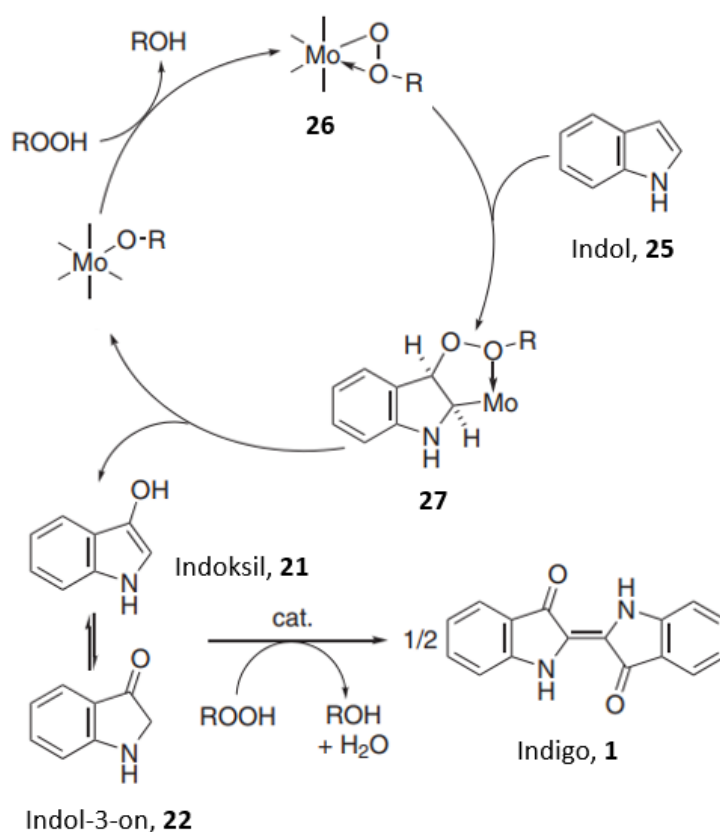
Indol se može oksidirati na mnogo načina: foto-oksidacijom, elektrokemijskom oksidacijom, djelovanjem ozona, manganova dioksida, vodikova peroksida ili peroksikiselina. U navedenom istraživanju kao oksidacijsko sredstvo koristila se lako dostupna peroksikiselina kumen-hidroperoksid (CHP) koja se na industrijskoj razini dobiva kao međuprodukt u proizvodnji fenola.²⁶ Efikasniji metalni kompleksi kao katalizatori u prisutnosti CHP su kompleksi molibdena, rutenija, titanija i bora, od kojih je molibdenov heksakarbonil, $\text{Mo}(\text{CO})_6$, najefikasniji. Vrsta otapala značajno je utjecala na prinos reakcije pripreve indiga. Otapala poput izobutilbenzena, kumena i *tert*-butilbenzena omogućila su veći prinos (55-60 %), dok su polarna otapala, izuzev alkohola, dala nezadovoljavajući prinos. Istražujući utjecaj alkohola na prinos reakcije uočeno je da dodatak *tert*-butilnog alkohola povećava prinos. Vjerojatna uloga alkohola je stabilizacija kompleksa molibdena s kojim stvara alkoksi-komplekse. Otapala s

većom mogućnošću koordinacije na metalni kation, poput anilina, piridina ili dimetilformamida (DMF) potpuno su spriječila reakciju. Nađene su dvije optimalne temperature provođenja reakcije, 80 °C i 100 °C, ovisno o udjelu katalizatora. Kako bi se dodatno poboljšao prinos, ispitivan je utjecaj dodatka raznih aditiva u reakcijsku smjesu poput alifatskih amina, aromatskih amina, nitrila, sulfida, fosfina i karboksilnih kiselina, te je jedino dodatak karboksilnih kiselina imao pozitivan učinak na prinos. Najbolji prinos reakcije od 81 % postignut je uz dodatak CHP-a kao oksidansa i *tert*-butilnog alkohola i kumena kao otapala. Uz dodatak octene kiseline i indola reakcijska smjesa se refluksirala 7 h pri 86 °C (slika 15.).



Slika 15. Shematski prikaz “one-pot” sinteze indiga iz indola

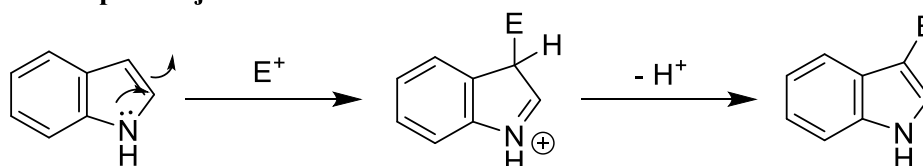
Prvi korak mehanizma je oksidacija pozicije 3 indola do 3-oksindola. Molibden-peroksi kompleks **26** aktivirana je vrsta prvog koraka koja reagira s indolom kako bi nastao peteročlani metalociklički kompleks **27**, čijom disocijacijom nastaje indoksil **21** koji tautomerizira u indol-3-on **22**. Elektrofili kisikov atom vezan na molibdenov atom u molibden-peroksi kompleksu **26** selektivno napada C-3 poziciju indola. Nastali indol-3-on radikalskim mehanizmom dimerizira i nastaje indigo **1** (slika 16.).²⁶



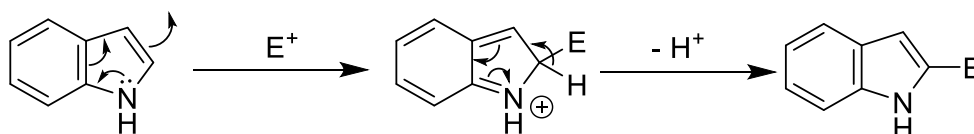
Slika 16. Shematski prikaz mehanizma sinteze indiga iz indola²⁶

Do visoke selektivnosti u reakciji oksidacije pozicije 3 indola dolazi radi toga što je kationski međuprodukt nastao elektrofilnim napadom na C-3 položaj stabilniji te se produkt rearomatizira. Kod elektrofilnog napada na C-2 položaj kationski međuprodukt ne bi mogao povratiti aromatičnost benzenskog prstena (slika 17.).

C-3 supstitucija



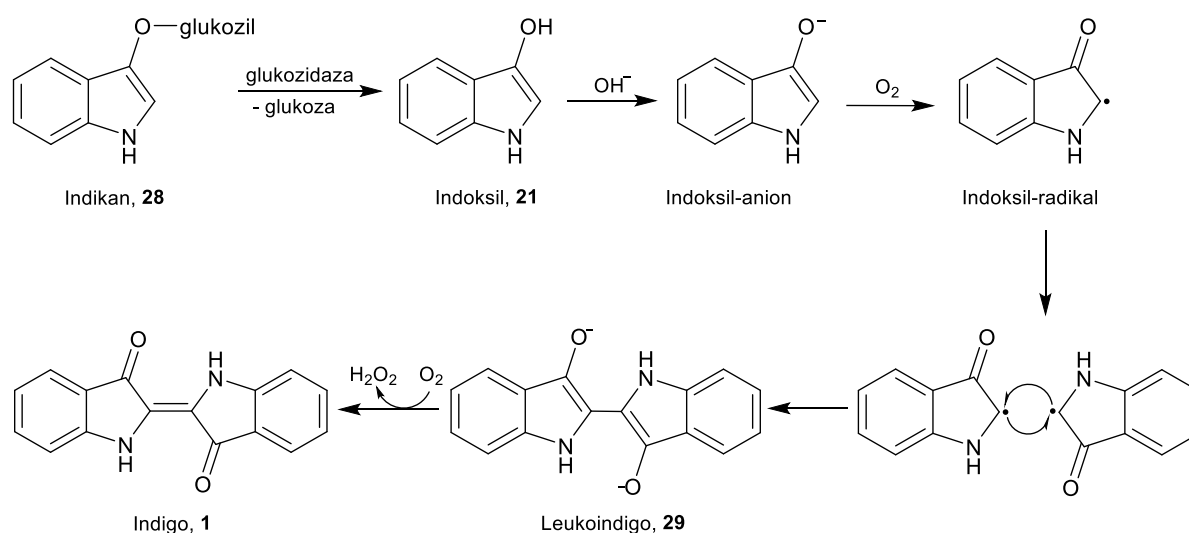
C-2 supstitucija



Slika 17. Shematski prikazi mehanizama reakcije supstitucije indola

2.2. Biotehnološke sinteze indiga

Prije 1897. godine kada je započelo dobivanje indiga sintetskim putem na industrijskoj skali, glavni izvor indiga bile su razne biljke roda *Indigofera* (*Indigofera tinctoria*) ili *Isatis* (*Isatis tinctoria*). Tehnika dobivanja bojila iz tih biljaka predstavlja rani oblik primijenjene biotehnologije, zato što je u obje biljke prisutan prekursor indiga koji se mora obraditi kako bi se došlo do samog indiga. Prekursor zvan indoksil **21** nalazi se u biljci kemijski vezan za specifičnu molekulu ugljikohidrata koja ovisi o vrsti biljke tvoreći glikozid. Glukozid indoksila, indikan **28**, nalazi se u stabljici ili lišću u udjelima od 0,2 – 0,8 %. Kako bi došlo do cijepanja glikozidne veze provodio se proces fermentacije. Biljke se neposredno prije cvjetanja beru te postavu u fermentacijske bačve u kojima su voda i lužnati dodaci (vapno ili amonijak), kako bi ubrzo došlo do fermentacije koja se mogla opaziti pjenjenjem i razvijanjem mjehurića ugljikova(IV) oksida. Za cijepanje kemijske veze u indikanu i nastanak indoksila i glukoze zaslužan je enzim indoksil- β -D-glukozidaza koji je prisutan u kloroplastu ili nastaje u biljci mikrobiološkom aktivnošću. Nastali indoksil otapa se u lužnatim uvjetima te se otpušta iz bačve i oksidira kisikom iz zraka do indiga radikalskim mehanizmom (slika 18.). U laboratorijskim uvjetima prinos ove reakcije iznosio je oko 85 %.^{12,27,28}



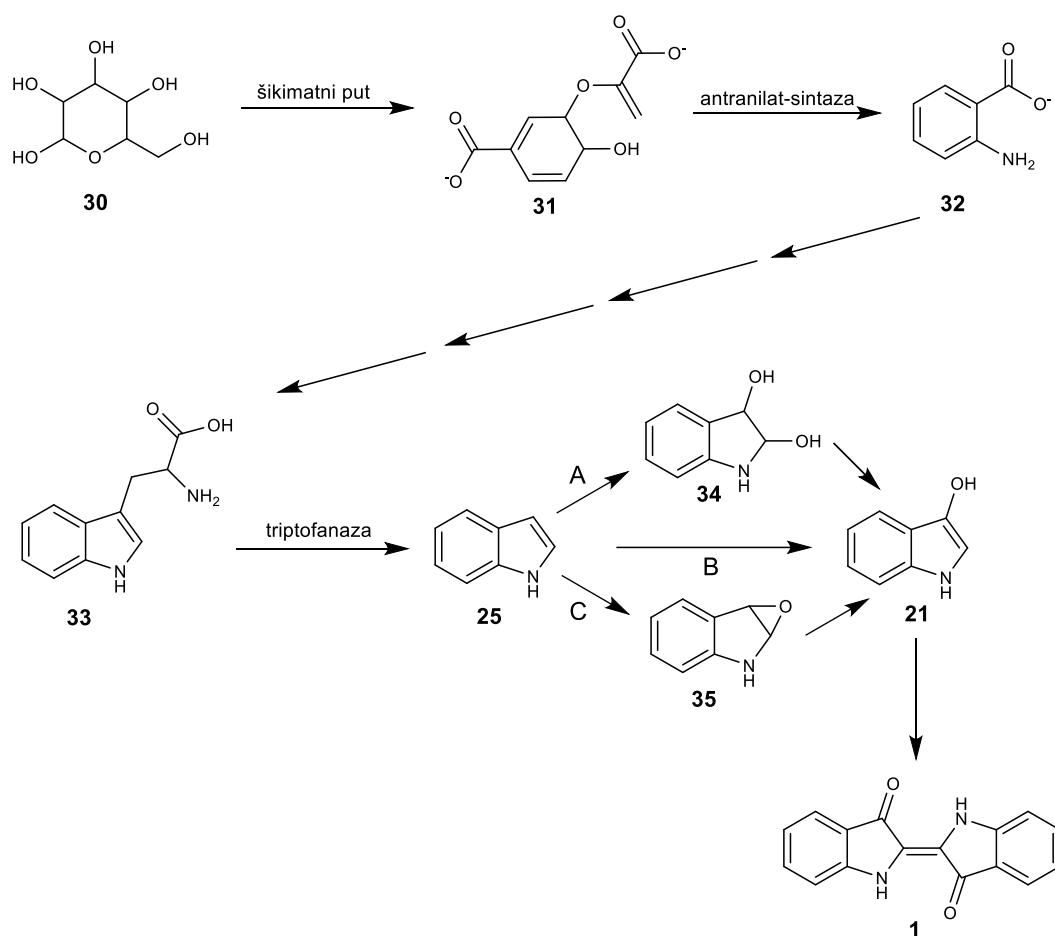
Slika 18. Shematski prikaz mehanizma pretvorbe indikana u indigo

Osim biljaka koje proizvode indigo, obilje mikroorganizama sadržava potrebne kemijske prekursore i enzime za sintezu indiga kao nusprodukta raznih metaboličkih procesa.

Trenutni kemijski postupci pripreme indiga ne počinju od obnovljivih materijala, već ovise o relativno jeftinim petrokemijskim prekursorima. Kemikalije korištene pri industrijskom dobivanju indiga nisu ekološki prihvatljive, te vode do kasnijih problema u odlaganju i zbrinjavanju industrijskog otpada.²⁹ U cilju stvaranja održivog procesa u proizvodnji indiga istražuju se mikrobne biotehnoške sinteze. Ove metode temelje se na primjeni oksidativnih enzima sadržanih u bakterijama koji mogu oksidirati indol koristeći elektron-donirajuće kofaktore poput nikotinamid-adenin-dinukleoid-fosfata (NADPH) ili nikotinamid-adenin-dinukleoida (NADH) i molekularni kisik. Prikladni enzimi mogu se podijeliti u tri skupine ovisno o kofaktoru kojeg koriste za oksidaciju indola: oksigenaze bez hemske skupine, hemske oksigenaze i flavin-ovisne monooksigenaze.³⁰

2.2.1. Oksigenaze bez hemske skupine

Naftalen-dioksigenaza (NDO) je višekomponentni enzimski sustav koji organizmu omogućava provođenje hidroksilacije naftalena i sličnih spojeva radi metabolizma takvih aromatskih spojeva. Osim oksigenazne komponente ima i flavin-ovisnu reduktazu i feredoksin u svrhu generiranja elektrona potrebnih za oksigenazu. Oksigenaza tvori $\alpha_3\beta_3$ heteroheksamernu strukturu građenu od dvije različite podjedinice α i β , a u podjedinici α nalazi se aktivno mjesto koje sadrži nehemoski kofaktor željeza. Željezo je koordinirano s dva histidina i jednim aspartatom, gdje se elektroni na njega prenose s feredoksina preko Rieskovog centra (2Fe-2S). Dodatkom triptofana, indola ili glukoze u hranjivi medij koji sadrži rekombinantne bakterije *E. coli* s ekspresijom gena za NDO dolazi do povećanog prinosa indiga. U metaboličkom šikimatnom putu glukoza **30** se prevodi preko šikimata i korizmata **31** u antranilat **32** koji se prevodi dalje u aminokiselinu triptofan **33**. Triptofan se zatim uz enzim triptofanazu prevodi u indol **25** koji se djelovanjem određenog enzima dioksigenacijom (put A), direktnom hidroksilacijom (put B) ili epoksidacijom (put C) (slika 19.) pretvara u indoksil **21** te u indigo **1**.³⁰



Slika 19. Shematski prikaz metaboličkog puta glukoze do triptofana i njegova pretvorba u indigo

Djelovanjem enzima NDO prvo nastaje indol-2,3-diol **34** a zatim indoksil koji se prevodi u indigo (put A). Opaženo je da rekombinantne *E. coli* s ekspresijom gena za enzim NDO stvaraju 36-300 mg indiga po litri bakterijske kulture.

Multikomponentne fenol-hidroksilaze (mPH) još su jedan primjer multikomponentnih bakterijskih enzima sposobnih proizvesti indigo. mPH se sastoji od heksamerne hidroksilaze građene od tri različite podjedinice $(\alpha\beta\gamma)_2$, flavoprotein reduktaze koja stvara i prenosi elektrone na oksigenaznu komponentu enzima i regulatornog proteina. mPH je efektivan u mono-hidroksilaciji fenola, te je stoga vjerojatni način sinteze indiga hidroksilacija indola u indoksil (put B na slici 19.). Ekspresija gena za enzim mPH u *E. coli* dovela je do stvaranja 52 mg/L indiga po litri medija za rast bakterija, dok je kod vrste *Acinetobacter* došlo do stvaranja 292 mg/L indiga. No, slično kao i kod enzima NDO izazovno je pronaći optimalne uvjete za funkcioniranje i normalnu ekspresiju svih komponenti enzima u rekombinantnom organizmu.

2.2.2. Hemske oksigenaze

Citokrom P450-monooksigenaze (CYP) sadrže hem kao redoks kofaktor, te omogućuju katalizu raznih oksidacijskih reakcija. Iako divlji tip enzima nije sposoban pretvoriti indol u indigo, 2000. godine otkriven je mutirani enzim koji ima tu sposobnost. Uvođenjem tri mutacije stvoreno je varijanta enzima koja ima visoki obrtni broj za supstrat indol ($k_{cat} = 2,7 \text{ s}^{-1}$) iz kojeg nastaje indoksil (put B na slici 19.).

Nespecifične peroksigenaze (UPO), za razliku od navedenih oksigenaza, ne ovisi o reduciranim kofaktorima poput NADH ili NADPH. Ovi enzimi kataliziraju oksidaciju uz pomoć vodikovog peroksida i hemskog kofaktora. U kataliziranoj reakciji nastaje međuprodukt 2,3-epoksindol **35** (put C na slici 19.) koji spontano prelazi u indoksil, no može nastati i nusprodukt 2-oksindol što sprječava potpunu pretvorbu indola u indigo. Još jedan problem je taj što je rekombinantna produkcija ovih enzima problematična te se lako inaktiviraju ukoliko je prisutna neodgovarajuća količina vodikovog peroksida.

2.2.3. Flavin-ovisne monooksigenaze

Stiren/indol-monooksigenaze su dvokomponentni enzimski sustavi koje ovisi o flavin-reduktazi i monooksigenazi koje su u većini slučajeva kodirane različitim genima. Većina nađenih stiren-monooksigenaza razgrađuje stiren, no radi manje specifičnosti prema supstratu može katalizirati pretvorbu indola u odgovarajući epoksid (put C na slici 19.). Ekspresija gena za enzim stiren-monooksigenazu u bakteriji *Pseudomonas putida* rezultirala je prozivodnjom 52 mg/L indiga.

Flavoprotein-monooksigenaze klase B (FMO) dimerni su i topljivi enzimi čija aktivnost ovisi o NADPH i kisiku. Iako je enzim najefikasniji s malim alifatskim aminima i sulfidima može kao supstrat prihvatiti i indol. Optimizacijom fermentacijskog procesa, koristeći *E. coli* kao rekombinantni organizam postignut je impresivan prinos indiga od čak 911 mg/L. Koekspresija bakterijskog FMO zajedno s glukozil-transferazom iz biljke u *E. coli* rezultirala je proizvodnjom indikana (2,9 g/L) koji služi kao prikladan prekursor indiga.

Postoje razni enzimi koji omogućavaju oksidaciju indola i njegovu pretvorbu u indigo, te ovisno o kojoj se vrsti radi nastaju različiti produkti oksidacije, a u nekim slučajevima i nusprodukti. Može se opaziti kako su neki enzimi efikasniji u proizvodnji indiga, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrili enzimski sustavi najprikladniji za biotehnološku proizvodnju indiga.

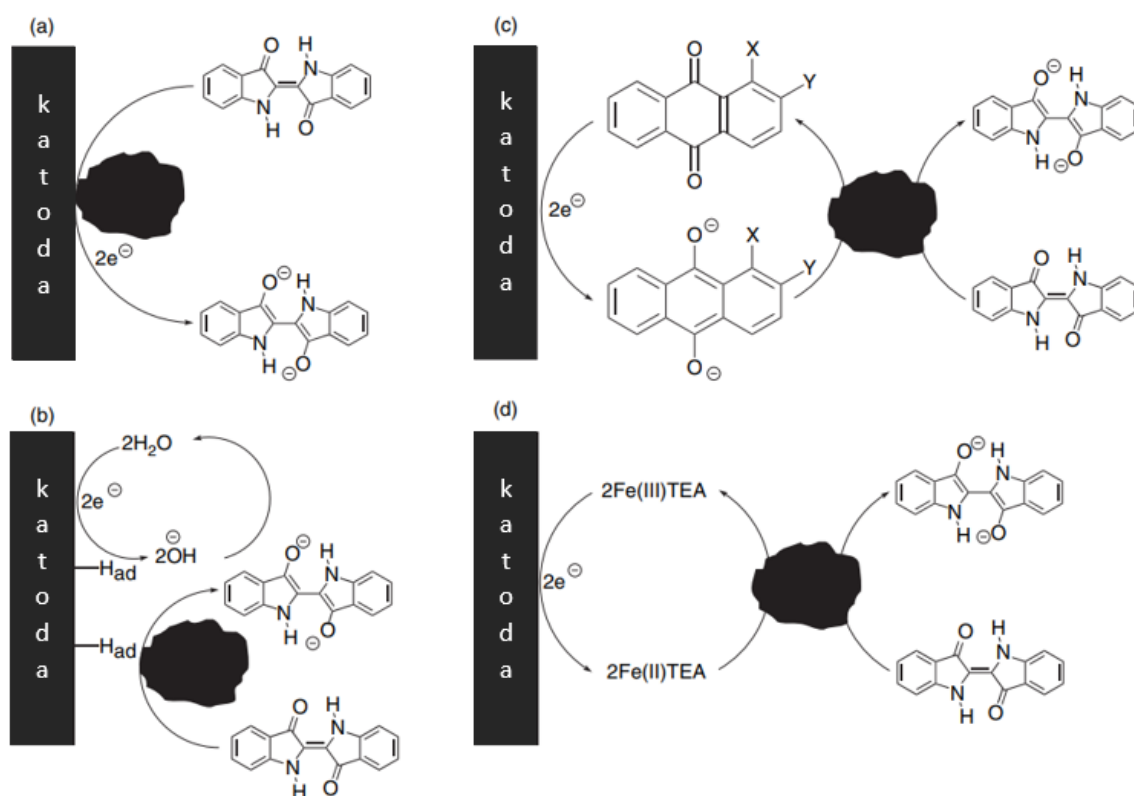
§ 3. PRIMJENA INDIGA

Indigo je jedno od najvažnijih tekstilnih bojila diljem svijeta, čija potražnja jako ovisi o modi. U usporedbi s drugim bojilima indigo se razlikuje u tome što se gotovo isključivo koristi za bojenje pređa u proizvodnji plavog traperera. Do 2011. godine proizvodilo se 50 000 t indigo bojila godišnje, od čega se 95 % koristilo za bojenje materijala za proizvodnju više od 4 milijarde traperica godišnje.³¹

Indigo je dostupan u obliku praha, granula ili u tekućem obliku. Tehnika bojenja u bačvi nije se mijenjala tijekom godina. U tom se postupku prvo redukcijom otopi bojilo u lužnatom mediju, zatim se željena tkanina boji u bačvi uz izlaganje zraku pri čemu oksidacijom nastaje netopljivi indigo. Prvi korak redukcije može se preskočiti koristeći priređenu otopinu već reduciranog indiga (leukoindiga). Na taj način može se uštedjeti i smanjiti uporaba redukcijskog sredstva (najčešće $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) što rezultira smanjenim ispuštanjem sulfata i sulfita u otpadne vode. Otpadne vode koje sadržavaju visoku koncentraciju sulfata i sulfita predstavljaju veliki problem, korozivne su te uništavaju cijevi. Također, nastali talozi sulfata anaerobnom razgradnjom mogu tvoriti toksične hidrogensulfidne ione, HS^- . Radi ovih ekoloških problema industrija je bila primorana odstupiti od korištenja $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ i usvojiti čišće tehnologije koje uključuju katalitičko hidrogeniranje i elektrokemijske metode.

Elektrokemijski procesi redukcije uključuju prijenos naboja između elektroda kroz otopinu elektrolita. Iz negativno nabijene katode elektrone se prenosi u elektrolit te se stoga redukcija događa u blizini katode. Nasuprot tome, pozitivno nabijena anoda privlači elektrone iz otopine elektrolita i može se smatrati čvrstim oksidansom. Elektrokemijska redukcija indiga može se provesti na više načina (slika 20.). Direktnom elektrokemijskom redukcijom, indigo prisutan kao disperzni materijal reducira se prijenosom elektrona s katode na netopljivi pigment koji u svojem reduciranom obliku postaje topljiv u lužnatoj otopini (slika 20(a)). Procesom elektrokatalitičkog hidrogeniranja dolazi do elektrolize elektrolita koja stvara adsorbirani vodik formiran *in situ* koji potom reducira dispergirani indigo analogno reakciji katalitičkog hidrogeniranja (slika 20(b)). Procesom indirektno redukcije, elektrolit sadrži otopljeni redoks-par (medijator) koji se reducira elektrokemijski i uspostavlja formalni redoks-potencijal koji je negativniji od redoks-potencijala para indigo/leukoindigo što omogućuje da medijator reducira dispergirani indigo. Jedna vrsta medijatora su spojevi supstituiranog antrakinona (antracene-9,10-dion) koji podliježu dvoelektronskoj redukciji u pripadajući antracene-9,10-diol (slika

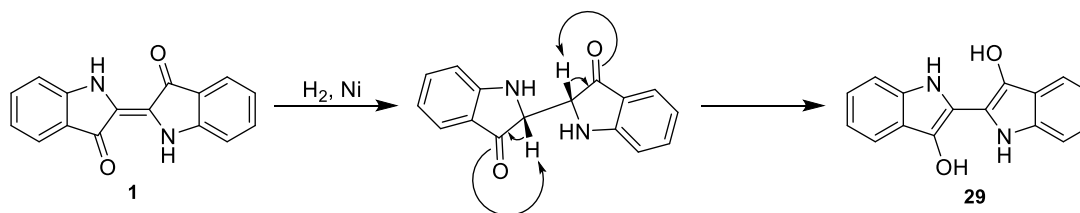
20(c)). Druga vrsta medijatora su kompleksi soli željeza s aminospojevima poput trietanolamina (TEA), koji kako bi bili prikladni medijatori moraju biti stabilni u lužnatom jer su neki željezo-amino kompleksi skloni taloženju željezovih hidroksida pri pH 9-10 (slika 20(d)).³²



Slika 20. Shematski prikaz elektrokemijske redukcije indiga:

- a) direktna elektrokemijska redukcija; b) elektrokatalitičko hidrogeniranje;
- c) indirektna elektrokemijska redukcija (antrakinonski medijator);
- d) indirektna elektrokemijska redukcija (medijator - kompleks željeza)³²

Katalitičko hidrogeniranje drugi je ekološki prihvatljiviji proces redukcije indiga. Nisu provedena istraživanja mehanizma katalitičkog hidrogeniranja indiga, no mehanizam katalitičkog hidrogeniranja alkena dobro je znan. Prvo se vodik adsorbira na površinu katalizatora (primjerice nikla), zatim se jedna strana π -veze alkena veže za katalizator na čiju je površinu adsorbiran vodik. Vodik se umeće u π -vezu s iste strane *syn*-stereokemijom te se produkt oslobađa s površine katalizatora. Predlaže se kako se indigo hidrogenira istom reakcijom te nastanak *syn* produkta iz kojeg zatim preuređenjem nastaje leukoindigo **29** (slika 21.).



Slika 21. Shematski prikaz katalitičkog hidrogeniranja indiga

Kao rezultat relativno niskog afiniteta indiga prema vlaknu, samo otprilike 10-20 % boje apsorbira vlakno, stoga se duboke plave nijanse postižu samo ako se postupci bojenja i oksidacije ponavljaju više puta. Zato je u prošlosti bilo potrebno i po nekoliko dana za proces bojenja indigom. U modernim postrojenjima za bojenje pređe za tkanje indigom, nekoliko kupki za bojenje i jedinica za oksidaciju raspoređeno je u nizu za kontinuiranu operaciju.³²

Traper se komercijalno boji u obliku konopca, pri čemu svaki konopac sadrži otprilike 300-400 pojedinačnih niti. Većina kontinuiranih industrijskih strojeva za bojenje indigom istovremeno obrađuje oko 24 konopca. Nakon namakanja konopci prolaze između valjaka za cijedenje, ponovno se ispiru i oksidiraju 45-90 sekundi te zatim uđu u kupku za bojenje gdje se zadrže 15-20 sekundi. Alkalni leukoindigo se postupno dodaje u kupku iz spremnika s Na₂S₂O₄ ili u novije vrijeme dodaje se indigo reduciran katalitičkim hidrogeniranjem.^{13, 32} Dok je kod bojenja tekstila plava nijansa poželjnija, u bojenju kose indigo se koristi uz boju kana kako bi se bakrena nijansa promijenila u smeđu ili crnu boju.²⁸

§ 4. ZAKLJUČAK

Indigo je organski spoj koji se kao modro bojilo upotrebljava tisućljećima, a danas ima najveću primjenu u bojenju tkanine za proizvodnju traperica. Prije otkrića strukture indiga i njegove laboratorijske pripreme dobivao se ekstrakcijom prekursora indikana iz biljaka koji se djelovanjem enzima pretvara u indoksil te se oksidira do indiga. Otkrićem strukture indiga 1883. godine došlo je do prvih kemijskih sinteza indiga pri čemu su bitnu ulogu imali Adolf von Baeyer i Karl Heumann. Polazeći od spojeva poput feniloctene kiseline, *o*-nitrobenzaldehyda ili anilina potaknuli su razvoj novih, sve efikasnijih sintetskih postupaka uz sve veće prinose, što je u konačnici rezultiralo proizvodnjom indiga na industrijskoj skali i njegovom komercijalnom upotrebom. Neke sirovine korištene u industrijskoj proizvodnji indiga imale su negativan učinak na okoliš i zdravlje, pa je potreba za ekološki prihvatljivijom proizvodnjom indiga dovela do razvitka biotehnoških metoda koje su otvorile vrata čistom i održivijem načinu dobivanja indiga. Povećanjem broja stanovnika na Zemlji raste i potražnja za traperom, te samim time i indigom koji je ključno bojilo u njegovoj proizvodnji. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se optimizirala njegova sinteza i primjena bez posljedica po okoliš.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=8458> (datum pristupa 7. svibnja 2023.)
2. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=8466> (datum pristupa 9. svibnja 2023.)
3. E. Kvavadze, O. Bar-Yosef, A. Belfer-Cohen, E. Boaretto, N. Jakeli, Z. Matskevich, T. Meshveliani, *Science* **325** (2009) 1359.
4. https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/prirodna_bojila.pdf (datum pristupa 10. svibnja 2023.)
5. <https://www.chemie.de/lexikon/Indigo.html> (datum pristupa 22. srpnja 2023.)
6. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=27333> (datum pristupa 15. svibnja 2023.)
7. Z. Ju, J. Sun, Y. Liu, *Molecules* **24** (2019) 3831–3845.
8. Z. Cao, *Indigo Derivatives and Their Colour*, Magistarski rad, Sveučilište u Durhamu, 2021, str. 27–28.
9. C. Reichardt, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, Wiley-VCH, Marburg, 2003, str. 334.
10. R. M. Christie, *Colour Chemistry*, The Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 2015, str. 50–52.
11. H.S. Correa, E. Ortiz, V.H. Uc, I.D.B. Quintal, J.L.H. Avila, *Mol. Simul.* **37** (2011) 1085–1090.
12. E. Steingruber, *Indigo and Indigo Colorants*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Frankenthal, 2012, str. 57–59., 62.
13. K. Hunger, *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Application*, Wiley-VCH, Kelkheim, 2002, str. 204–213.
14. F. Sánchez-Viesca, R. Gómez, *World J. Org. Chem.* **6** (2018) 6–12.
15. H. Shmitz, *Chem. Unserer Zeit* **3** (1997) 121–128.
16. G. Nagendrappa, *Resonance* **19** (2014) 489–522.
17. A. Baeyer, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **11** (1878) 582–584.
18. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2010, str. 144–145.

19. A. Baeyer, V. Drewsen, *Chem. Ber.* **15** (1882) 2856–2864.
20. https://www.ld-didactic.de/documents/en-US/EXP/C/C2/C2411_e.pdf (datum pristupa 21. lipnja 2023.)
21. F. Sánchez-Viesca, M. Berros, R. Gómez, *Am. J. Chem.* **6** (2016) 18–22.
22. K. Heumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **23** (1890) 3043.
23. D. C. Nwokonkwo, C. O. Okafor, *Int. J. Appl. Chem.* **12** (2016) 67–74.
24. <https://textileinsight.blogspot.com/2019/10/production-of-synthetic-indigo.html> (datum pristupa 27. lipnja 2023.)
25. P. J. Llabres-Campaner, R. Ballesteros-Garrido, R. Ballesteros, B. Abarca, *J. Org. Chem.* **83** (2017) 521–526.
26. Y. Yamamoto, Y. Inoue, U. Takaki, H. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **84** (2011) 82–89.
27. M. Seefelder, *Indigo in culture, science and technology*, Ecomed, Landsberg, 1994, str. 15–16.
28. T. Bechtold, R. Mussak, *Handbook of Natural Colorants*, Wiley, Chichester, 2009, str. 108–114., 343–344.
29. J.A. Linke, A. Rayat, J.M. Ward, *Bioresour. Bioprocess.* **10** (2023) 20.
30. A.N. Fabara, M.W. Fraaije, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104** (2020) 925–933.
31. L. Shan, A. B. Cunningham, Y. Shi, Z. Qiu, A. Hartl, X. Ding, S. Wu, Y. Wang, *Ind. Crops Prod.* **188** (2022) 1–15.
32. R. S. Blackburn, T. Bechtold, P. John, *Color. Technol.* **125** (2009) 193–207.