

Ispitivanje primjene ploda šumske tise, *Taxus baccata* L., kao kiselo-baznog indikatora

Gajić, Tatjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:390178>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski sveučilišni studij kemije

Tatjana Gajić

**Ispitivanje primjene ploda šumske tise,
Taxus baccata L., kao kiselo-baznog indikatora**

Završni rad

Osijek, 2023.

SAŽETAK

Pomoću pH vrijednosti možemo opisati kemijske uvjete u otopini i odrediti točku ekvivalencije. Osim toga, mjerenje pH vrijednosti koristi se i izvan kemijskog laboratorija, primjerice u svrhu poboljšanja kvalitete ljudskog zdravlja možemo provjeriti i kontrolirati pH vrijednost tla, vode ili hrane. U kemiji su najzastupljeniji konvencionalni kiselo-bazni indikatori, a sve se više radi na razvoju prirodnih kiselo-baznih indikatora. Tako pripremljeni indikatori sadrže biljne pigmente koji mijenjaju boju ovisno o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal primjene bobica šumske tise (*Taxus baccata* L.) kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s odabranim otapalima (voda, metanol, etanol i aceton). Naime, bobice šumske tise izrazito su crvene boje i sadrže polifenole i karotenoide, što upućuje na moguću upotrebu kao kiselo-bazni indikator. Rezultati ispitivanja pokazali su vizualno najdojmljivije rezultate pri $\text{pH} = 14$, a aceton se pokazao kao najpogodnije otapalo za pripremu ovih indikatora.

Ključne riječi: šumska tisa, pH, kiselo-bazni indikatori, prirodni indikatori, aceton, etanol, metanol

ABSTRACT

Using the pH value, we can describe chemical conditions in solution and determine the equivalence point. pH value measurement is also used outside of chemical laboratory, for example in order to improve the quality of health, we can check and control the pH value of soil, water or food. Conventional acid-base indicators are the ones most commonly used in chemistry, but there is a lot of effort being put in the development of natural acid-base indicators. Indicators prepared in this way contain plant pigments that change colour depending on the pH value their environment. The aim of this work was to examine the potential of yew berries (*Taxus baccata* L.) as acid-base indicators in combination with selected solvents (water, methanol, ethanol and acetone). Yew berries are bright red and contain polyphenols and carotenoids, which points to their potential use as acid-base indicators. Obtained results showed visually most impressive results at pH = 14, and acetone showed to be the most suitable solvent for preparation of these indicators.

Key words: yew, pH, acid-base indicators, natural indicators, acetone, ethanol, methanol

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Šumska tisa, <i>Taxus baccata</i> L.....	2
2.1.1. Biologija šumske tise	3
2.1.2. Kemijski sastav bobica i toksičnost šumske tise.....	5
2.2. Kiselo-bazni indikatori	11
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Biljni materijal, korištene kemikalije i pribor.....	15
3.2. Priprema otopina, postupak i plan rada	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Rezultati neposredno nakon pripreme indikatora	17
4.1.1. Voda kao otapalo.....	17
4.1.2. Metanol kao otapalo	18
4.1.3. Etanol kao otapalo	19
4.1.4. Aceton kao otapalo.....	19
4.2. Rezultati 24 sata nakon pripreme indikatora	20
4.2.1. Voda kao otapalo.....	20
4.2.2. Metanol kao otapalo	21
4.2.3. Etanol kao otapalo	22
4.2.4. Aceton kao otapalo.....	22
4.3. Rezultati tjedan dana nakon pripreme indikatora	23
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURNA VRELA.....	27

1. UVOD

pH vrijednost je mjera kiselosti, odnosno bazičnosti, pojedine otopine. Određivanje pH vrijednosti je neophodno jer ona predstavlja važnu karakteristiku otopine, vode, tla ili hrane. Kontrolom pH vrijednosti možemo poboljšati kvalitetu i sigurnost proizvoda, a samim time i kvalitetu zdravlja. Danas se za određivanje pH vrijednosti najvećim dijelom koriste pH metri i sintetski kiselobazni indikatori koji često znaju biti skupi ili nedostupni te štetni. Prirodni indikatori sadrže biljne pigmente koji mijenjaju boju ovisno o pH vrijednosti medija u kojem se nalaze. Razvojem prirodnih kiselobaznih indikatora omogućena je upotreba puno većem broju korisnika, a moguće je i smanjiti količinu otpada nastalog prilikom pripreme i nakon upotrebe indikatora.

Šumska tisa, *Taxus baccata* L., široko je rasprostranjena i lako dostupna biljka budući da se često sadi u parkovima i vrtovima kao ukrasna biljka. Svi dijelovi biljke su otrovni, osim mesnatog ovoja koji obavija sjemenku (arilus). Crvena boja i kemijski sastav bobica upućuju na prisutnost pigmenta koji otvaraju mogućnost upotrebe tise kao kiselobaznog indikatora, stoga je cilj ovog rada ispitati potencijal upotrebe bobica šumske tise u tu svrhu. U prvom dijelu rada opisan je biljni materijal koji se ispituje kao kiselobazni indikator. Opisane su njegove karakteristike, stanište i kemijski sastav. Navedene su i opisane tvari koje mogu utjecati na promjenu boje pri određenoj pH vrijednosti. Ukratko je objašnjen princip rada kiselobaznih indikatora te su navedeni primjeri sintetskih i prirodnih kiselobaznih indikatora.

U drugom dijelu rada dan je popis korištenog materijala i metoda. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama i poredani prema planu rada. Ispitana je funkcionalnost indikatora pripremljenih od bobica šumske tise s različitim otapalima (voda, metanol, etanol i aceton), a uočene promjene su prodiskutirane i pojašnjene. Vizualno najdojmljiviji rezultati dobiveni su pripremom indikatora s acetonom te se tako pripremljen indikator može koristiti kao kiselobazni indikator za izrazito bazičan medij.

2. LITERATURNI PREGLED

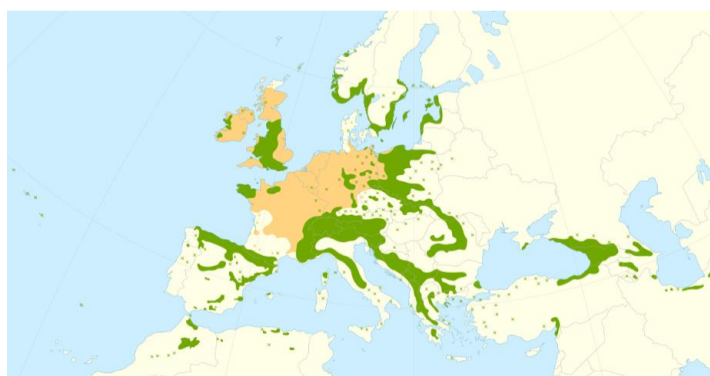
2.1. Šumska tisa, *Taxus baccata* L.

Obična ili šumska tisa (*Taxus baccata* L.) je vazdazeleni grm ili stablo iz istoimene porodice tisa (Taxaceae) [1-3]. Sistematska klasifikacija šumske tise prikazana je u Tablici 1. Kao što se može vidjeti, u tablici je navedeno nekoliko naziva pojedinih kategorija. Naime, pregled literature ukazao je na različitu klasifikaciju ovisno o izvoru (razne europske baze (FloraVeg.EU, Flora Croatica Database i dr.), a u tablici su navedene najčešće spominjane kategorije.

Tablica 1. Klasifikacija šumske tise [4-8].

Carstvo	Plantae
Koljeno	Spermatophyta / Pinophyta
Razred	Equisetopsida / Pinopsida
Red	Cupressales / Pinales
Porodica	Taxaceae
Rod	Taxus
Vrsta	<i>Taxus baccata</i> L.

Kao što je prikazano na Slici 1., tisa je široko rasprostranjena a može se naći na području Europe, zapadne Azije i sjeverozapadne Afrike. Raste ili pojedinačno ili u malim skupinama u šumama brdske i planinske regije (na 1500-1700 m nadmorske visine). Staništa pogodna za rast moraju biti dobro drenirana, podnosi i izravno Sunce i sjenu, ali je osjetljiva na velike temperaturne razlike i oštre zime [1, 3, 9-11].

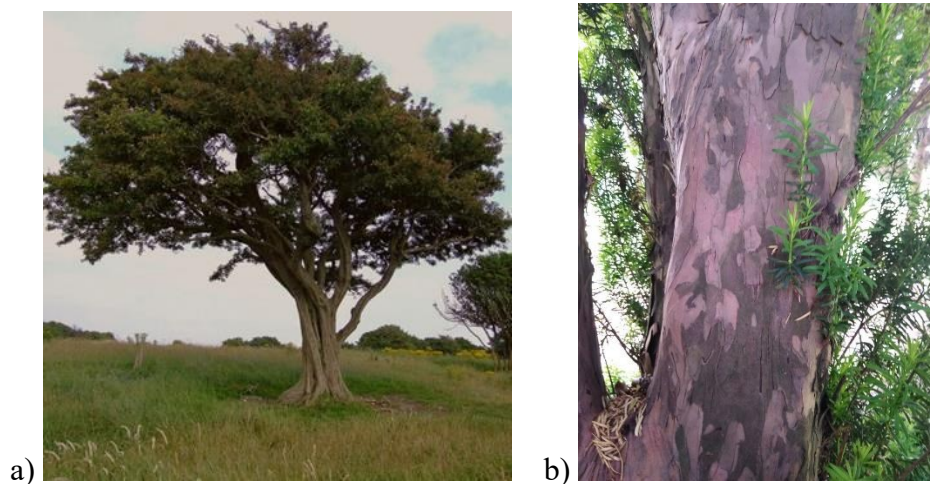


Slika 1. Rasprostranjenost šumske tise [12].

U brojnim državama unutar EU, tisa je proglašena strogo zaštićenom vrstom a u RH ima status kritično ugrožene vrste (CR) i strogo je zaštićena (Zakon o zaštiti prirode NN 80/13, 15/18, 14/19) [3, 13]. Ima veliki hortikulturni značaj te se često sadi u parkovima, botaničkim vrtovima, dvorištima crkvi, samostana i groblja. Sadi se i kao živica i kao stablo, a razvijeni su razni varijeteti tise od kojih neki imaju žute (a ne crvene) ariluse (Slika 4. d)) [1, 11].

2.1.1. Biologija šumske tise

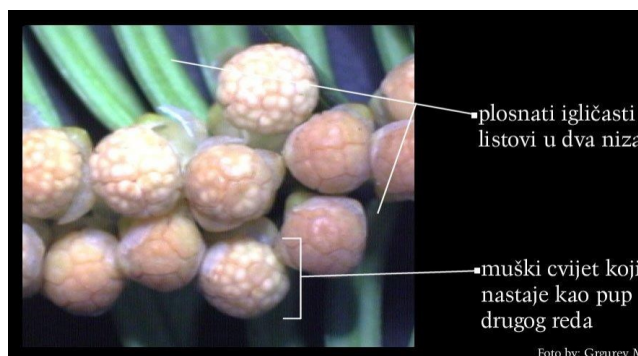
Stablo šumske tise u prosjeku naraste 12-15 m u visinu, ali može narasti i do 20 m, pri čemu formira široku, zaobljenu, čvrstu i nalik grmu krošnju (Slika 2. a)). Samo stablo tise ponekad nalikuje grmu pa ju se zna zamijeniti za grm, pogotovo kada se radi o mladim stablima tise. Krošnja nije uvijek nepravilna već može imati i piramidalan oblik. Tisa formira široko deblo čiji promjer može ići i preko 1 m, a što je promjer debla veći to je oblik debla nepravilniji. Kora debla i granja je tanka, kod mlađih biljaka obično crvenosmeđe boje dok je kod starijih primjeraka sivosmeđa i ispucana (budući da je tanka, stara kora lako pukne i ljušti se, a ljuskice izgledaju kao mali listići koji ponekad mogu biti ljubičaste boje, Slika 2. b)) [1-3, 11, 14].



Slika 2. a) Stablo šumske tise s grmolikom krošnjom [15] i deblo b) [3].

Grane su uobičajene zelene do zelenosmeđe boje, najčešće vodoravne ili blago povijene budući da tisa formira dosta duge grane (ali na to utječu i uvjeti kojima je biljka izložena, a ponekad i sama starost biljke). Iznimka su grane koje rastu na nižim dijelovima

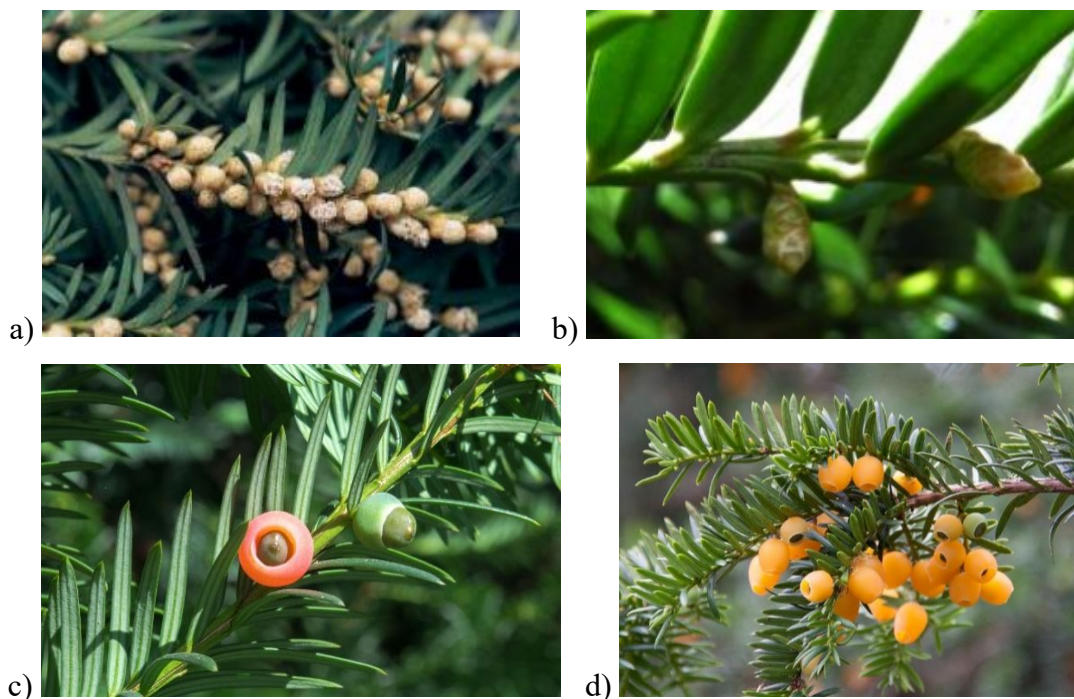
stabla, odnosno uz zemlju, čiji je rast usmjeren u visinu (prema gore). Na granama se nalaze listovi koji su igličasti, mekani i plosnati, na licu tamnozeleno sjajne boje, a na naličju svijetlozelene boje. Listovi tj. iglice rastu u dva niza (češljasto), prosječno su dugi 1-3,5 cm i široki 2-3 mm, pri bazi su naglo suženi, imaju dvije blijedozelene pruge (s pučima) i naglo ušiljeni vrh (Slika 3.). Listovi najčešće ostanu oko 4-8 godina na grani [1-3, 7, 11, 14, 16, 17].



Slika 3. Izdanak tise s označenim listovima i muškim cvijetom [16].

Tisa ima jak i dobro razgranat korijen, s istaknutom glavnom žilom čiji rast seže duboko u tlo. Glavna žila je izuzetno jaka i otporna te može praviti problem ukoliko se tisa želi odstraniti iz vrta (tada je potrebno iskopati sve korijenje, inače će tisa ponovo niknuti iz preostalog korijenja). Tisa raste relativno sporo (u godini naraste oko 20-30 cm) i može doživjeti veliku starost (preko 1000 godina) [1, 7, 11, 14, 17]. U RH, u Gorskom kotaru nalazi se primjerak tise star oko 2000 godina [18]. Najstariji primjerak tise je u Velikoj Britaniji je Fortingall Yew u Perthshiru, čija se starost procjenjuje na 3000-5000 godina [10].

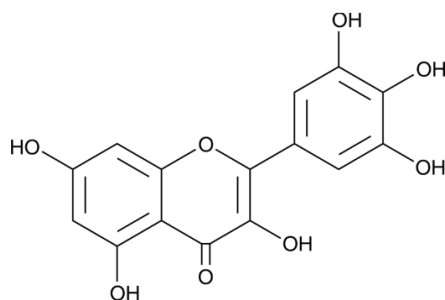
Biljka je dvodomna, što znači da jedna biljka ima jednospolne cvjetove pa govorimo o muškim i ženskim biljkama. Muški cvjetovi se formiraju u jesen, izgledaju kao glavice s 5-14 prašnika (i svijetlo žutom peludi) a nalaze se u pazušcima s donje strane jednogodišnjih listova (Slike 3. i 4. a)). Ženski cvjetovi se formiraju u proljeće, isto u pazušcima jednogodišnjih listova, zeleni su, sitni i imaju nekoliko ljusaka, a oprašuju se pomoću vjetra (Slika 4. b)). Iz oplodnog ženskog cvijeta formira se bobica s tamnosmeđom sjemenkom obavijenom već spomenutim arilusom (prvotno zelen, starenjem pocrveni, Slika 4. c)). Bobice sazrijevaju u jesen [1, 2, 7, 10, 11, 14, 17, 19].



Slika 4. a) Muška biljka [17] i ženska biljka b) tise u cvatu [20], te c) bobice tise s crvenim [1] i d) žutim arilusom (*T. baccata* „Lutea“) [21].

2.1.2. Kemijski sastav bobica i toksičnost šumske tise

Svi dijelovi tise, osim arilusa, otrovni su. Sadrže složenu mješavinu spojeva, uključujući fenolne sastojke (npr. 3,5-dimetoksifenol), nealkaloidne diterpenoide (npr. 10--deaktetilbakatin III), alkaloidne diterpenoide (npr. taksin A, taksin B), flavonoide (npr. miricetin, Slika 5.) i bioflavonoide (npr. bilobetin) [22-24].

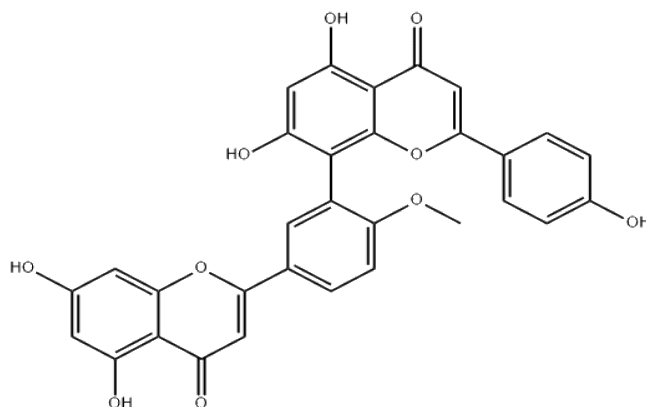


Slika 5. Struktura miricetina [25].

Flavonoidi se klasificiraju na flavane, flavone, flavonole i antocijanidine, a u slučaju tise ističe se miricetin (Slika 5.). Kemijska stabilnost miricetina ovisi o pH i temperaturi. Miricetin je uglavnom prisutan u obliku glikozida (*O*-glikozidi) u povrću, voću, orašastim plodovima, bobicama, ljekovitom bilju i vinu. Brojni su čimbenici koji mogu utjecati na razinu miricetina u biljnoj hrani, kao što su genetski i okolišni čimbenici, klijavost i stupanj zrelosti, sorta, sezonske varijacije te skladištenje. Miricetin je moguće ekstrahirati, a skladišti se u obliku praha koji je žute boje [26].

Prosječna konstanta disocijacije miricetina ($pK_a = 6,63 \pm 0,09$) ukazuje na značajnu ionizaciju miricetina pri fiziološkom pH, no miricetin je slabo topljiv u vodi ($16,60 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$). U puferiranim otopinama, topljivost miricetina u vodi bolja je pri kiseloj pH. Osim toga, miricetin je dobro topljiv u polarnim organskim otapalima a manje u nepolarnim. Miricetin pokazuje niz raznolikih bioloških aktivnosti, kao što je antioksidacijska, antikancerogena, protuupalna, antibakterijska, antivirusna i antidijabetička aktivnost. Iako je miricetin predmet brojnih istraživanja, nema radova koji proučavaju značaj miricetina kao kiselo-baznog indikatora [27].

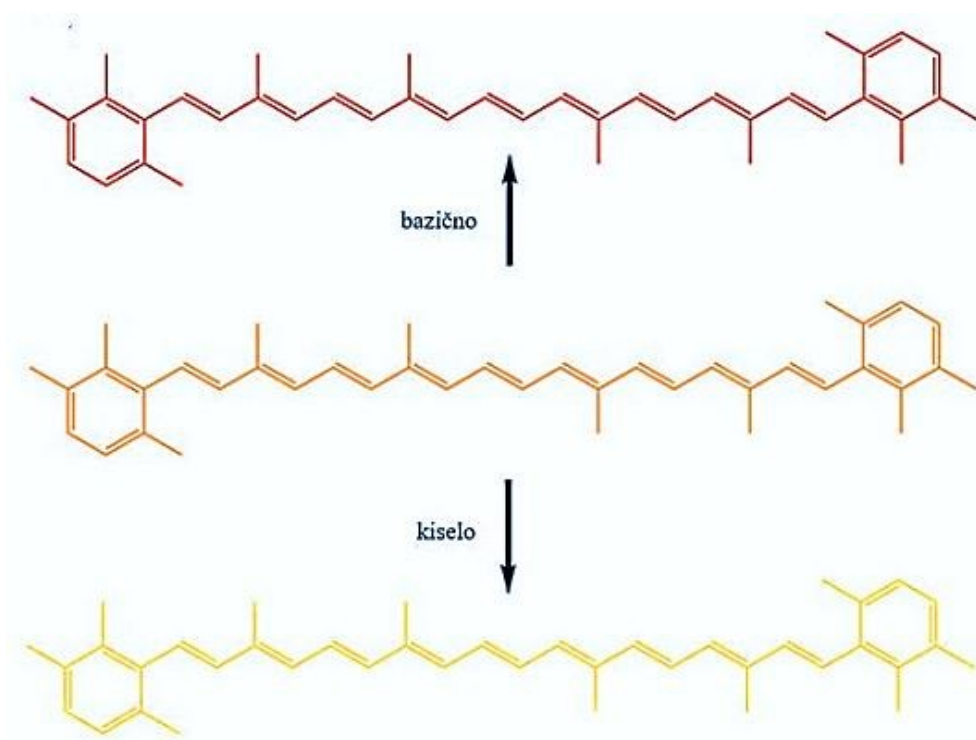
Krauze-Baranowska i Wirwart (2003) prvi su koji su iz iglica tise izolirali bioflavonoid bilobetin (inače spoj karakterističan za ginko, *Ginkgo biloba* L.) [24]. Bilobetin (Slika 6.) ima niz pozitivnih učinaka, primjerice snižava koncentraciju lipida u krvi i poboljšava djelovanje inzulina. Hirata i sur. (2015) utvrdili su da je bilobetin dobiven iz ginka topljiv u metanolu, etanolu i drugim organskim otapalima te slabo topljiv u vodi [28]. Bilobetin se prodaje kao prah bijele boje, a otapanjem daje žuto obojenje otopini [29]. Prema dostupnoj literaturi, nema studija o bilobetinu kao kiselo-baznom indikatoru.



Slika 6. Struktura bilobetina [29].

U bobicama tise otkriveni su i karotenoidi, posebice oni s retro-strukturama poput rodoksantina, ali i likopen i zeaksantin [30-33], koji inače doprinose žutoj, crvenoj i narančastoj boji voća i povrća te bi mogli poslužiti kao kiselo-bazni indikatori. Boja ovisi o konjugiranim dvostrukim vezama i funkcijskim skupinama (povećanjem broja konjugiranih dvostrukih veza rastu apsorpcijski maksimumi, pa boja varira od žute, crvene do narančaste) [34].

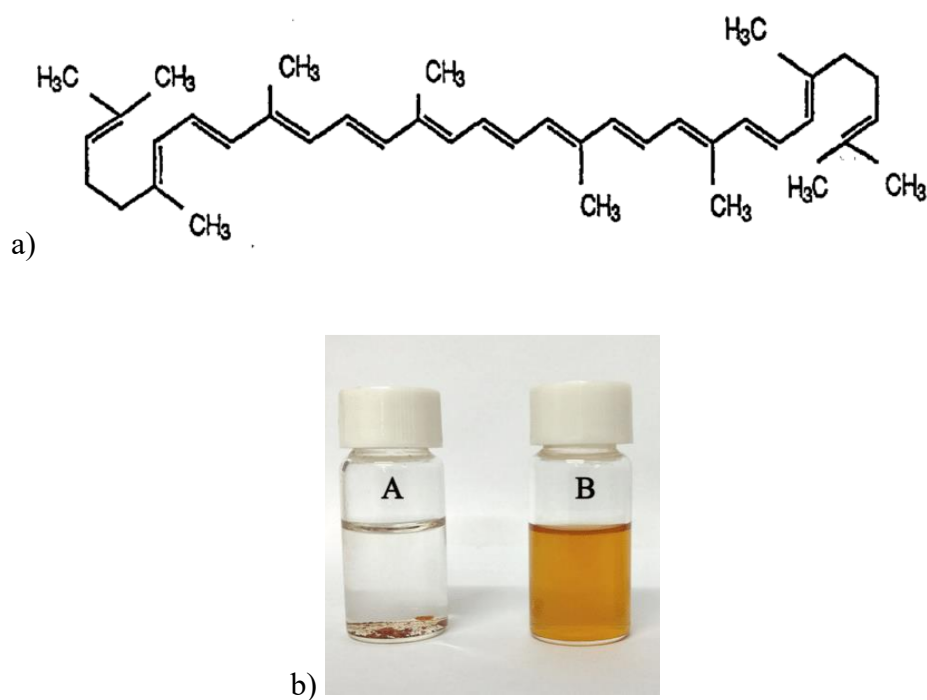
Nestabilnost karotenoida u kiselim uvjetima obično se pripisuje protoniranju karotenoida, periodu izlaganja kiselim uvjetima, koncentraciji kiseline, cis-trans izomerizaciji i dodatnim reakcijama razgradnje [35]. Karotenoidi imaju jasnu boju pri niskom pH zahvaljujući ionskom paru koji može odvojiti karbokation. Suprotno tome, zamućenje boje može biti uzrokovano reakcijom karotenoida kojom se opiru promjeni iz trans-izomera u cis-izomer (Slika 7.) [36].



Slika 7. Struktura i boja karotenoida u bazičnom (gore), neutralnom (sredina) i kiselom (dolje) mediju [37].

Jedan od spomenutih karotenoida u bobicama tise je likopen (Slika 8. a)), koji doprinosi boji bobice [30]. Nurul Aida i sur. (2021) zaključili su da pH ima značajan utjecaj na stabilnost likopena te da bazičan medij snažno utječe na degradaciju likopena, gdje je već

pri pH = 9 primjećena degradacija od 91,4 %. Likopen u bazičnom mediju gubi pigmentaciju, a to može biti posljedica karakteristika sustava s dvostrukim vezama, kao što je slučaj kod većine karotenoida [38]. Likopen, koji je lipofilni pigment, je netopljiv u vodi, etanolu i metanolu, a obično se otapa u organskim otapalima kao što su tetrahidrofuran, kloroform, heksan, benzen, ugljikov disulfid, aceton, petrol eter i ulje (Slika 8. b)) [30].



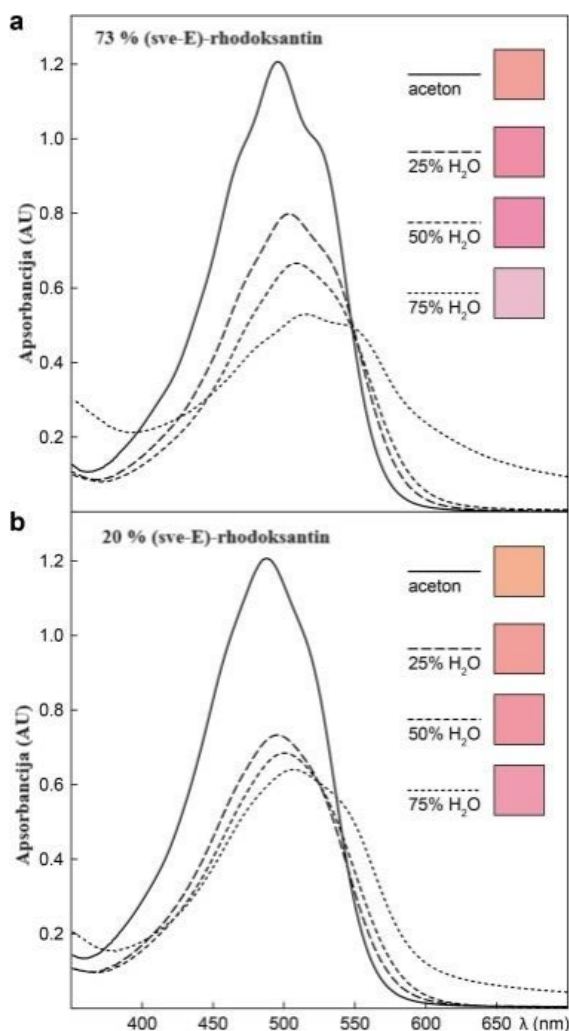
Slika 8. a) Struktura likopena [39] i b) likopen otopljen u destiliranoj vodi (A) i u acetonu (B) [40].

Dumitras i sur. (2022) proveli su fitokemijsku karakterizaciju arila tise kojom su utvrdili ukupni sadržaj polifenola (i na temelju toga ispitali antioksidacijsku aktivnost) i ukupni sadržaj karotenoida, te potvrdili prisutnost rodoksantina, β -karotena i luteina. Utvrdili su da je prosječan sadržaj ukupnih karotenoida u arilu 3,378 mg/100 g, 2,564 mg/100 g, ukupnih polifenola 145,71 mg/100 g a flavonoida 44,723 mg/100 g. Od fenolnih spojeva dokazali su prisutnost hidrokscimetnih i hidrokscibenzojevih kiselina te flavanola. Prilikom otapanja, rodoksantin podliježe izomerizaciji pa se u otopinama obično nalazi mješavina 3 različita izomera rodoksantina – trans-izomer, 6-mono-cis i 6,6'-di-cis izomer [32].

Prema Chex i sur. (2020), aril tise sadrži 21 karotenoid (u različitim izomernim oblicima), od kojih su najvažniji retro-strukturirani karotenoidi, rodoksantin i eschscholtz-

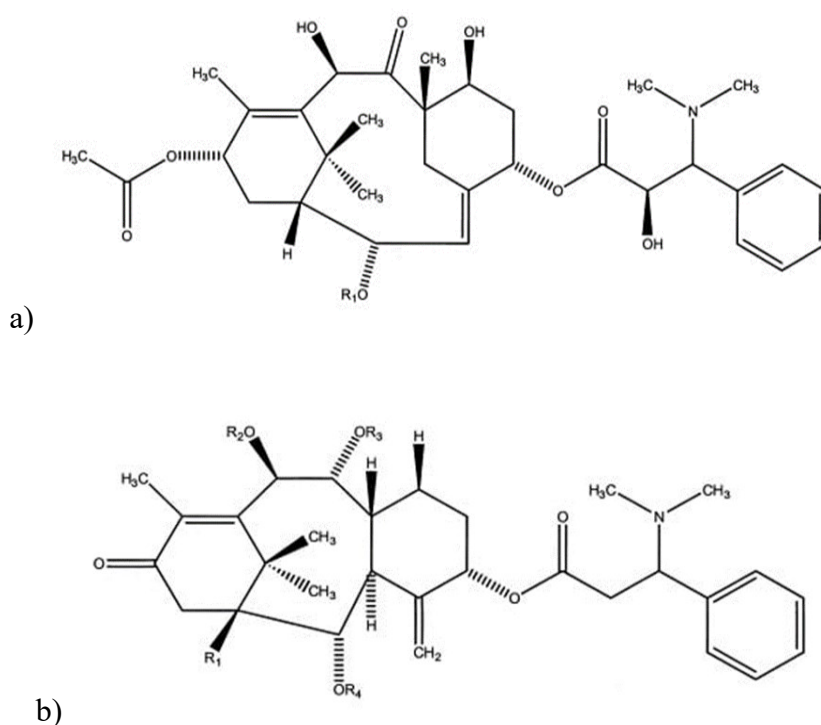
ksantin. U manjim količinama utvrđeni su violaksantin, zeaksantin, β -kriptokksantin, lutein i β -karoten. Istraživanjem je utvrđeno da je glavni pigment od navedenih rodoksantin, koji je pokazao apsorpcijski maksimum pri 478-502 nm za sve analizirane rodoksantin (E/Z) izomere (pri čemu je 502 nm je pik za (sve-E)-rodoksantine, a 494 i 486 nm za (6Z)- odnosno (6Z,6'Z)-rodoksantine). Autori su utvrdili da u ekstraktu svježeg arila tise oko 77 % ukupnog sadržaja karotenoida odlazi na izomere rodoksantina, čija je čistoća 89,7 % [33].

Rodoksantin je slabo istražen crveni pigment, a Schex i sur. (2020) proveli su ispitivanje utjecaja E/Z-izomerizacije i agregacije na boju rodoksantina. Utvrdili su da je liotropna agregacija mješavina izomera rodoksantina (E/Z) u acetonu/vodi dala crvene (CIE-- $h^\circ = 29^\circ$) do ljubičaste (-7°) i crveno-narančaste (44°) do ružičaste (9°) nijanse boje u (sve-E)-udjelima od 73 odnosno 20 % (Slika 9.) [31].



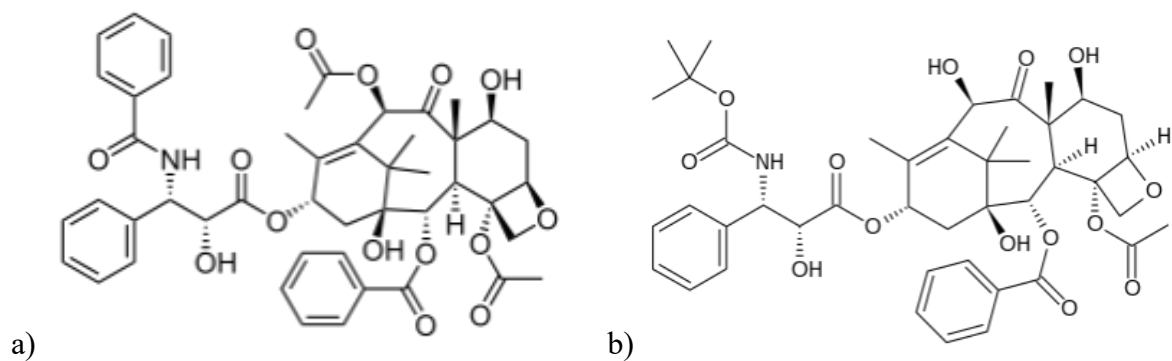
Slika 9. Promjena boja (sve-E)-rodoksantina sa 73 %-tnim udjelom (a) i 20 %-tnim udjelom (b) [31].

Toksični učinci tise pripisuju se prisutnosti alkaloida taksina, koji su prisutni u svim dijelovima biljke osim u arilu [41, 42]. Dvije glavne skupine alkaloida koje su izolirane nazivaju se taksin A i taksin B (Slika 10.). Taksin A čini 1,3 % sastava izoliranog alkaloida, dok taksin B čini 30 %. Pokazalo se da je taksin B jači od taksina A na životinjskim modelima i smatra se da je glavni krivac za toksičnost tise. Taksini A i B djeluju kao antagonisti kalcijevih i natrijevih kanala. Za taksin B je utvrđeno da povećava vrijeme atrioventrikularnog (AV) provođenja, produljuje trajanje QRS-a (kombinacija Q, R i S vala u elektrokardiografiji) i smanjuje kontraktilnost miokarda. Ovi spojevi djeluju izravno na srčane miocite i njihovi učinci se ne mogu poništiti atropinom [41].



Slika 10. Struktura a) taksina A i b) taksina B [43].

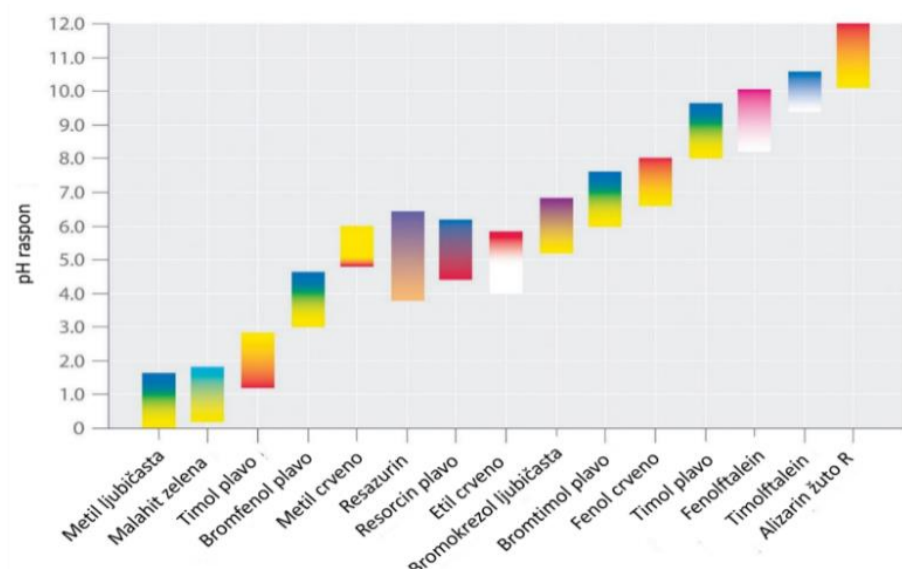
Naposljetku, tisa ima značajnu ulogu u modernoj terapiji. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća paklitaksel je izoliran iz kore pacifičke tise, a kasnije docetaksel iz kore europske tise. Navedeni spojevi (Slika 11.) inhibiraju mitozu potiskujući stvaranje mikrotubula i sada su glavno uporište u liječenju raka dojke, jajnika i pluća. Svjetska zdravstvena organizacija ih smatra „esencijalnim lijekovima“, što znači da se mogu propisivati i izdavati na teret sredstava obaveznog zdravstvenog osiguranja [44].



Slika 11. Struktura a) paklitaksela [45] i b) docetaksela [46].

2.2. Kiselo-bazni indikatori

Pri određivanju pH vrijednosti otopina u kemiji koriste se kiselo-bazni indikatori, tj. pH indikatori. Većina kiselo-baznih indikatora koji su danas u upotrebi su slabe organske kiseline ili baze koje mijenjaju boju kao posljedicu ionizacijskog stanja. Pri radu s indikatorima, vrlo je važno odabrati odgovarajući indikator [47, 48]. Razvijeni su sintetski indikatori koji pokrivaju cijeli pH raspon, a Slika 12. prikazuje približni pH raspon u kojem neki uobičajeni indikatori mijenjaju boju i njihovu promjenu boje.



Slika 12. Promjene boje pojedinih sintetskih indikatora ovisno o pH [48].

Neki indikatori (kao što je timol plavo) su poliprotične kiseline ili baze, koje dvaput mijenjaju boju pri široko razdvojenim pH vrijednostima. Kako se koncentracija indikatora smanjuje, a koncentracija deprotoniranog oblika indikatora povećava, boja otopine se polako mijenja od karakteristične boje indikatora do boje deprotoniranog oblika [48].

Kiselo-bazni indikatori koji se najčešće koriste su lakmus papir, fenolftalein, metiloranž te univerzalni indikator koji može biti u obliku otopine ili papira [47, 48]. Univerzalni indikator (Slika 13.) je kombinacija različitih pokazatelja pH. Većina univerzalnih indikatora temelji se na patentiranoj formuli koju je Yamada razvila 1933. godine. Najčešće sadrži timol plavo, metil crveno, bromtimol plavo i fenolftalein. To je jednostavna metoda te detektira pH = 1-14. Najčešće boje univerzalnog indikatora su crvena i izrazito narančasta u području pH = 1-3, narančasta u području pH = 3-6, žuta pri pH = 7, zelena u području pH = 8-11 i tamno zelena koja prelazi u tamno plavu u području pH = 11-14. Univerzalni indikator dolazi s tablicom boja koja objašnjava očekivane boje i raspone pH [49, 50].



Slika 13. Otopina i papir univerzalnog indikatora te tablica boja [51].

Lakmus papir je jedan od najpoznatijih i najjednostavnijih vrsta indikatorskog papira. Neutralni lakmus papir ljubičaste je boje i promjena boje u crvenu ili plavu ovisi o tome je li ispitivana otopina kisela ili bazična [52, 53].

Fenolftalein (3,3-bis(4-hidroksifenil)-2-benzofuran-1-on, $C_{20}H_{14}O_4$) ima dvije različite strukture ovisno o tome je li u bazičnoj (ružičasta boja otopine) ili kiseljoj (bezbojno) otopini [54]. Dodatkom metiloranža (4-[[4-(dimetilamino)fenil]diazetil] benzen-1-sulfonat), $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$) u bazičnu otopinu dolazi do promjene obojenja iz narančaste u žutu, dok u kiseljoj sredini dolazi do promjene boje u crvenu [55].

Prirodni kiselo-bazni indikatori sadrže biljni pigment (ili pigmente) koji mijenja boju ovisno o pH medija. Neki od biljnih pigmenata su klorofil A i B (zeleni), karotenoidi (narančasti, crveni, žuti) i antocijanini (crveni, plavi i ljubičasti). Neki od primjera prirodnih kiselo-baznih indikatora su crveni kupus, kurkuma, sok od grožđa, cikla, luk, rajčica, itd. [56].

Sok od grožđa, plavih ili crnih sorti, mijenja boju ovisno o pH vrijednosti otopine (Slika 14.). Dodatkom soka od grožđa u kiselu otopinu dolazi do promjene boje u crvenu, a dodatkom soka od grožđa u bazičnu otopinu dolazi do promjene boje u tamno zelenu boju. Blago bazična otopina je plave boje [57].



Slika 14. Sok od grožđa u kiselom (crveno), neutralnom (ljubičasto) i bazičnom (plavo do tamno zeleno) mediju [57].

Kurkuma (*Curcuma longa* L.) se najčešće koristi kao začin u prehrani te je za boju kurkume odgovoran žuti pigment kurkumin. Kurkumin u kiselom i neutralnom mediju ima žuto obojenje, dok u bazičnom mediju pokazuje narančastu ili crvenkasto-smeđu boju (Slika 15.) [58].



Slika 15. Kurkumin u kiselom (lijevo), neutralnom (sredina) i bazičnom (desno) mediju [59].

Također, neki cvjetovi mogu biti pokazatelji pH vrijednosti pa mogu pokazati je li npr. tlo kiselo ili bazično. Primjer je velelisna hortenzija (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.), ukrasna biljka koja pripada skupini kritosjemenjača. Zbog prisutnosti pigmenata

antocijanina njezin cvijet mijenja boju u ovisnosti o pH tla (Slika 16.), ali na boju utječu i neki metali (npr. aluminij) [60-62].



Slika 16. Boja cvijeta hortenzije u ovisnosti o pH tla [62].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal, korištene kemikalije i pribor

U ovom radu korištene su svježe zrele bobice šumske tise, *T. baccata* L. Sve kemikalije koje su korištene u radu su analitičke čistoće, a korištena voda (priprema otopina određene pH vrijednosti i otopina uzoraka) je deionizirana i demineralizirana. Popis korištenih kemikalija uključuje:

1. klorovodična kiselina, HCl (M = 36,46 g/mol, Kemika)
2. natrijev hidroksid, NaOH (M = 39,99 g/mol, Kemika)
3. etanol, C₂H₅OH (M = 46,07 g/mol, Kemika)
4. metanol, CH₄O (M = 32,94 g/mol, Kemika)
5. aceton, C₃H₆O (M = 58,08 g/mol, Kemika)

U radu su korištene: jažice, keramički tarionik s tučkom, staklene čaše, odmjerne tikvice, epruvete, stalak, kapalice, stakleni štapić, pinceta, pipeta, staklene bočice s čepom, Eppendorf tube. Od uređaja je korištena analitička vaga, vortex miješalica, uređaj za ultračistu vodu (TKA, WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME) i pH metar (METTLER TOLEDO, SevenEasy).

3.2. Priprema otopina, postupak i plan rada

Otopine određene pH vrijednosti korištene u radu pripremljene su prema prethodno opisanom protokolu [63]. Sve pH vrijednosti otopina određene su pomoću pH-metra.

Biljnom materijalu, bobicama tise, odstranjene su sjemenke. Indikatori su priređeni gnječenjem tako priređenih bobica (1 g) uz dodatak otapala (10 mL) – hladne vode, vruće vode, etanola, metanola ili acetona. Tako pripremljenom indikatoru se odmah nakon pripreme ispitao potencijal primjene kao kiselo-baznog indikatora te nakon 24 sata stajanja u hladnjaku. U nekoliko navrata tijekom 24 sata i neposredno prije samog ispitivanja, epruvete s pripremljenim indikatorom su kratko vorteksirane.

U Eppendorf tubama pripremljen je indikator dodatkom 1 g biljnog materijala i 1 mL otapala te je skladišten u hladnjaku tjedan dana. Ovako pripremljen indikator trebao bi imati veću koncentraciju te je skladišten dulje vrijeme kako bi se provjerilo hoće li veća

koncentracija i duže vrijeme ekstrakcije dati bolji rezultate. Nakon pripreme i neposredno prije samog ispitivanja, Eppendorf tube s pripremljenim indikatorom su kratko vorteksirane. Nakon tjedan dana ispitan je potencijal ovako pripremljenih indikatora kao kiselo-baznih indikatora, a pH pri kojima je indikator ispitan bili su $\text{pH} = 1$, $\text{pH} = 7$ i $\text{pH} = 14$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati neposredno nakon priprave indikatora

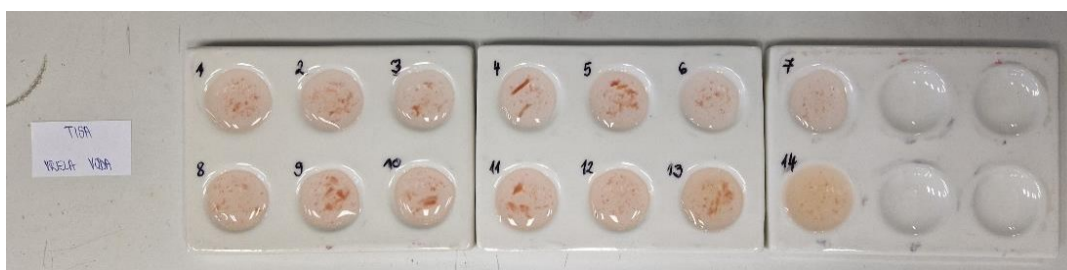
4.1.1. Voda kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s hladnom i vrućom ultračistom vodom prikazani su na Slikama 17. i 18.



Slika 17. Indikator pripremljen od bobica tise i hladne vode.

Rezultati ispitivanja pokazuju da ukoliko se koristi hladna voda kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise dolazi do minimalne promjene boje samo pri $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 13 obojenje je blago narančasto, dok je pri $\text{pH} = 14$ boja za nijansu tamnija.



Slika 18. Indikator pripremljen od bobica tise i vruće vode.

Ukoliko se koristi vruća voda kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise dolazi do minimalne promjene boje pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 12

obojenje je blago narančasto. Pri pH = 13 i pH = 14 narančasto obojenje postaje nijansu intenzivnije.

Vruća voda pokazuje malo bolje rezultate u jako bazičnom mediju. Važno je uzeti u obzir da je većina pigmenata iz bobica tise slabo ili gotovo netopljiva u vodi. Kao što je spomenuto, primjerice likopen je netopljiv u vodi, metnolu i etanolu, a uz to u bazičnom mediju se degradira. Boja karakteristična za karotenoide (u kiselom žuto, u bazičnom tamno narančasto) nije došla do izražaja. Uočena boja upućuje dijelom na rodoksantin (Slika 9.), koji je možda prigušio obojenja povezana s karotenoidima zbog čega je uočena svjetlija boja u kiselom, neutralnom i blago bazičnom mediju (ali nema jasno žutog obojenja u kiselom mediju). Boji su mogli pridonijeti i polifenoli (flavonoidi) koji su u arilu prisutni u većim koncentracijama u odnosu na karotenoide.

4.1.2. Metanol kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise kao kiselobaznog indikatora u kombinaciji s metanolom prikazani su na Slici 19.



Slika 19. Indikator pripremljen od bobica tise i metanola.

Upotrebom metanola kao otapala u kombinaciji s bobicama tise dolazi do minimalne promjene boje pri pH = 14. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 13 obojenje je breskvaste boje. Pri pH = 14 obojenje postaje nijansu intenzivnije te ima žuti odsjaj. Žuti odsjaj mogao bi biti rezultat prisutnih polifenola (u jako bazičnom mediju daju žutu boju). Za karotenoide je već spomenuta slaba topljivost u ovom otapalu, ali su i prisutni u puno manjim koncentracijama u odnosu na polifenole (flavonoidi) [32].

4.1.3. Etanol kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s etanolom prikazani su na Slici 20.



Slika 20. Indikator pripremljen od bobica tise i etanola.

Bobice tise u kombinaciji s etanolom daju minimalne promjene boje pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 12 obojenje je breskvaste boje. Pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ obojenje ima žuti odsjaj i podton. Komponenta zaslužna za žuti odsjaj i podton su vjerojatno prisutni polifenoli (flavonoidi).

4.1.4. Aceton kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s acetonom prikazani su na Slici 21.



Slika 21. Indikator pripremljen od bobica tise i acetona.

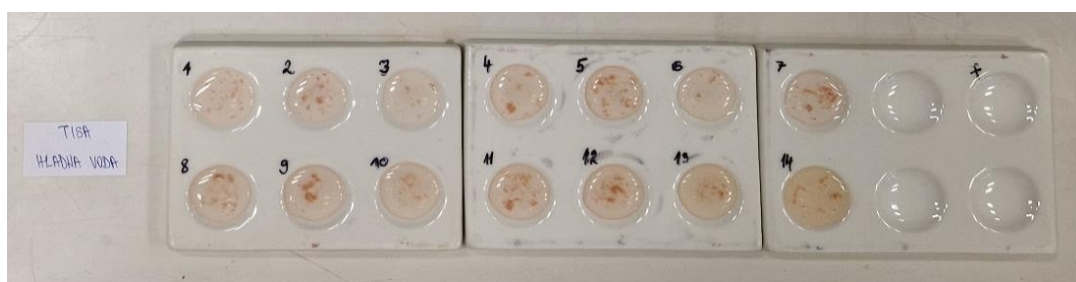
Rezultati ispitivanja s acetonom kao otapalom u kombinaciji s bobicama tise daju promjene boje pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 12 obojenje je

breskvaste boje. Pri $\text{pH} = 13$ obojenje je blago narančasto sa žutim odsjajem, a pri $\text{pH} = 14$ obojenje je narančaste boje. Bobice tise sadrže rodoksantin koji je dobro topljiv u acetonu, a uočeno obojenje slično je onome na Slici 9. Ipak, pojava žutog odsjaja u jako bazičnom mediju vjerojatno je rezultat prisutnih polifenola (flavonoida).

4.2. Rezultati 24 sata nakon priprave indikatora

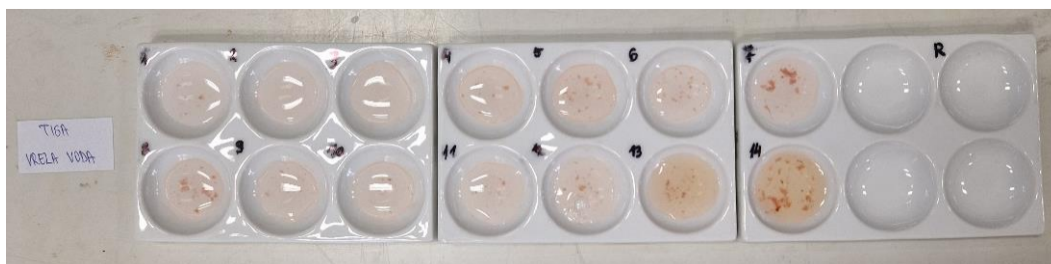
4.2.1. Voda kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise kao kiselo-baznog indikatora, 24 sata nakon priprave indikatora, u kombinaciji s hladnom i vrućom ultračistom vodom prikazani su na Slikama 22. i 23.



Slika 22. Indikator pripremljen od bobica tise i hladne vode nakon 24 sata.

Rezultati ispitivanja pokazuju da ukoliko se koristi hladna voda kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise dolazi do minimalne promjene boje samo pri $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 13 obojenje je blago narančasto, dok je pri $\text{pH} = 14$ boja nijansu intenzivnija. Usporedbom rezultata s ispitivanjem neposredno nakon priprave indikatora, vidljivo je da su boje slabijeg intenziteta.



Slika 23. Indikator pripremljen od bobica tise i vruće vode nakon 24 sata.

Ukoliko se koristi vruća voda kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise dolazi do minimalne promjene boje pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 12 obojenje je blago narančasto. Pri $\text{pH} = 13$ vidljiv je narančasti odsjaj koji je za nijansu intenzivniji pri $\text{pH} = 14$. Bobice tise uz vodu kao otapalo ne daju dobro vidljive rezultate ni 24 sata nakon pripreme indikatora. Kao što je prethodno spomenuto, komponente koje se nalaze u arilu tise su najvećim dijelom netopljive u vodi. Usporedbom indikatora, pripremljenog s vrućom vodom, nakon 24 sata obojenje je svjetlije u odnosu na rezultate ispitivanja neposredno nakon pripreme indikatora. Međutim, razlika između jako bazičnog dijela i preostalih pH vrijednosti jače dolazi do izražaja (jer je obojenje u preostalim pH vrijednostima slabije nakon 24 h).

4.2.2. Metanol kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise, 24 sata nakon pripreme indikatora, kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s metanolom prikazani su na Slici 24.



Slika 24. Indikator pripremljen od bobica tise i metanola nakon 24 sata.

Rezultati ispitivanja pokazuju da ukoliko se koristi metanol kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise ne dolazi do zamjetne promjene boje. Uočene promjene boje su jako slabo izražene te indikator pripremljen na ovaj način nije vizualno značajan. U usporedbi s ispitivanjem provedenim odmah nakon pripreme indikatora, breskvasto obojenje je jako izbljedito pri svim pH vrijednostima, što pokazuje da duže vrijeme ekstrakcije u metanolu nije dalo dobre rezultate (intenzitet boje je opao umjesto da se poveća).

4.2.3. Etanol kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise, 24 sata nakon pripreme indikatora, kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s etanolom prikazani su na Slici 25.

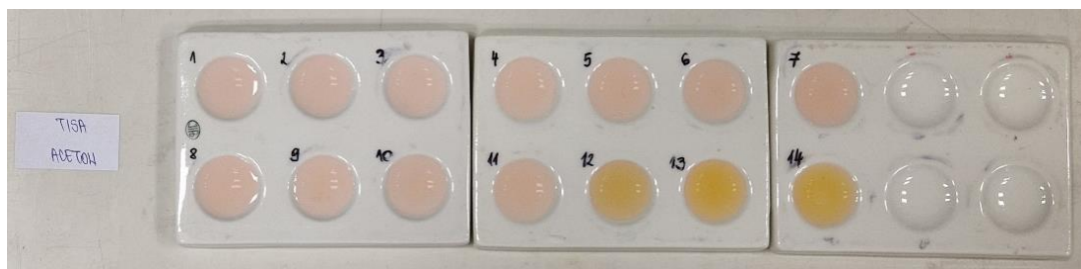


Slika 25. Indikator pripremljen od bobica tise i etanola nakon 24 sata.

Etanol kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise daje jako blage promjene pH vrijednosti u lužnatom mediju. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 12 obojenje je breskvaste boje. Pri pH = 13-14 obojenje ima žuti odsjaj i podton te je nijansu intenzivnije porastom pH. Dulja ekstrakcija nije značajno utjecala na rezultate ispitivanja. Boje su ostale gotovo nepromijenjene u odnosu na ispitivanje provedeno neposredno nakon pripreme indikatora.

4.2.4. Aceton kao otapalo

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ispitivanje potencijala bobica tise, 24 sata nakon pripreme indikatora, kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s acetonom prikazani su na Slici 26.



Slika 26. Indikator pripremljen od bobica tise i acetona nakon 24 sata.

Rezultati ispitivanja pokazuju da ukoliko se koristi aceton kao otapalo u kombinaciji s bobicama tise dolazi do promjene boje pri $\text{pH} = 12-14$. Pri nižim pH vrijednostima od 1 do 11 obojenje je izraženo žuto-narančaste boje. Pri $\text{pH} = 12$ obojenje postaje intenzivnije žuto-narančasto, a pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ boja je izrazito žuto-narančasta. Ovako pripremljen indikator, koji je stajao 24 sata, daje jasnije i bolje vidljive rezultate. Žuta boja moguće je rezultat prisutnosti polifenola (flavonoida, pa i flavonoidnih kopigmenata).

4.3. Rezultati tjedan dana nakon priprave indikatora

Obzirom da rezultati prethodna dva ispitivanja nisu bili obećavajući, provedeno je dodatno ispitivanje u kojem je pripremljen indikator veće koncentracije koji je tjedan dana stajao u hladnjaku. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 27.-31.



Slika 27. Indikator pripremljen u Eppendorf tubama od bobica tise i hladne vode.

Boja indikatora pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 7$ je jednaka. Pri $\text{pH} = 14$ breskavsto obojenje ima žuto-narančasti odsjaj. Duljom ekstrakcijom intenzitet obojenja se povećao, u odnosu na rezultate prethodnih ispitivanja.



Slika 28. Indikator pripremljen u Eppendorf tubama od bobica tise i vruće vode.

Boja indikatora pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 7$ je jednaka, a pri $\text{pH} = 14$ blago crveno obojenje poprima narančasti odsjaj. Kao i kod pripreve indikatora s hladnom vodom, duljom ekstrakcijom povećao se intenzitet obojenja.



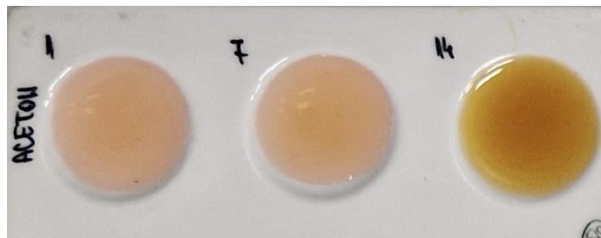
Slika 29. Indikator pripremljen u Eppendorf tubama od bobica tise i metanola.

Indikator pripremljen s metanolom je jako svijetle, gotovo bijele, boje pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 7$. U izrazito bazičnom mediju pri $\text{pH} = 14$ obojenje je svijetlo narančasto. Breskvasta boja i odsjaj iz prethodnih ispitivanja potpuno su promijenjeni. Duža ekstrakcija dala je jasnije vidljivu razliku u obojenju pri $\text{pH} = 14$, u odnosu na prethodno provedena ispitivanja.



Slika 30. Indikator pripremljen u Eppendorf tubama od bobica tise i etanola.

Indikator pripremljen s etanolom daje jako svijetle boje u svim medijima te vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na rezultate ispitivanja. Pri pH = 1 i pH = 7 boja je blijedo breskvasta, a pri pH = 14 nazire se žuto-narančasti odsjaj.



Slika 31. Indikator pripremljen u Eppendorf tubama od bobica tise i acetona.

Pripremom indikatora s acetonom rezultati su jasno vidljivi. Dulja ekstrakcija značajno poboljšava rezultate. U kiselom i neutralnom mediju obojenje je breskvaste boje, a u izrazito bazičnom mediju boja je tamno narančasta.

U ovom dodatnom ispitivanju svi indikatori pokazuju intenzivnije obojenje pri pH = 14. Aceton se ističe najintenzivnijim obojenjem. Kod etanola razlika u obojenju je najslabije vidljiva, ali se ipak vidi. Ovako pripremljeni indikatori mogu se koristiti kao indikatori za jako bazičan medij.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je primjena arila bobica šumske tise (*Taxus baccata* L.) kao alternativnog kiselo-baznog indikatora. Cilj je bio pripremiti indikator od biljnog materijala koji je lako dostupan, široko rasprostranjen i niske cijene. Naime, upotrebom novih alternativnih indikatora smanjuje se potražnja za klasičnim sintetskim indikatorima. Uz to, biljni materijal nije štetan za okoliš, što olakšava skladištenje i odlaganje nastalog otpada. Ovakve indikatore moguće je pripremiti u malim količinama, a sam proces pripreme je jednostavan i brz. U ispitivanju je naglasak bio na ekonomičnosti, koristila se mala masa biljnog materijala i mali volumen otapala.

Pigmenti tise nisu čest predmet istraživanja, iako se u posljednje vrijeme sve više istraživanja bavi ovom temom. Rezultati nekih od njih ukazuju na kvantitativan sastav pigmenata arila (znači, ukupni polifenoli), ali ne i na kvalitativan sastav. Upravo poznavanje tipa pigmenata, primjerice polifenolnog profila, pomogao bi u razumijevanju dobivenih rezultata. Iako su u arilu dokazani karotenoidi, utvrđeni rezultati odudaraju od uobičajenih promjena boje prikazanih na Slici 7., što dijelom može biti posljedica koncentracije karotenoida u korištenom materijalu, njihove (ne)topljivosti u korištenim otapalima, ali i koncentracije ostalih pigmenata koji su možda maskirali karotenoide. Dobiveni rezultati odudaraju i od onih prikazanih na Slici 9., što opet može biti posljedica konkretnih okolnosti rada (rad je proveden s biljnim materijalom, ne čistim kemijskim spojevima, koji je smjesa više spojeva).

Rezultati ispitivanja pokazali su da se bobice tise mogu koristiti kao prirodni indikatori, ali uz ograničenja. Voda, metanol i etanol dali su rezultate koji su slabo vidljivi pri svim pH vrijednostima s izuzetkom pri pH = 14. Aceton se pokazao kao najpogodnije otapalo s jasno vidljivim obojenjem (narančasta boja) u izrazito bazičnom mediju (pH = 12-14). Uočene promjene boje vjerojatno su najvećim dijelom rezultat prisutnih polifenola (flavonoida), obzirom da uočene boje odudaraju od boja karakterističnih za karotenoide. Ispitivanje je pokazalo da indikator duljim stajanjem nakon pripreme daje intenzivnije obojenje, a samim time i pouzdanije rezultate. Stoga bi povećanje biljne mase, smanjenje količine otapala i/ili duže vrijeme ekstrakcije, moglo dati bolje rezultate u odnosu na dobivene u ovom radu. Osim toga, odabir drugih otapala, recimo organskih, mogao bi dati povoljnije rezultate.

6. LITERATURNI VRELA

- [1] <https://www.plantea.com.hr/tisa/> (10. 8. 2023.)
- [2] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=61448> (23. 9. 2023.)
- [3] <https://bjelovar3.drvo.kod.eu/tisa/> (23. 9. 2023.)
- [4] <http://hirc.botanic.hr/sist-bot/Documents/Sistematska%20botanika-08-Gymnospermae.pdf> (30. 8. 2023.)
- [5] <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:4314/preview> (30. 8. 2023.)
- [6] R. Domac, Flora Hrvatske, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
- [7] <https://bjelovar4.drvo.kod.eu/drvo/red/obicna-tisa/> (23. 9. 2023.)
- [8] <https://floraveg.eu/taxon/overview/Taxus%20baccata> (23. 9. 2023.)
- [9] <https://www.vrtlarica.hr/tisa-sadnja-uzgoj/> (23. 9. 2023.)
- [10] <https://crvenipopis.haop.hr/preglednik/3250> (23. 9. 2023.)
- [11] <https://www.agroklub.com/hortikultura/tisa-tisucljetni-grm-koji-ubija-i-lijeci/29761/> (23. 9. 2023.)
- [12] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Taxus_baccata_range.svg#/media/File:Taxus_baccata_range.svg (17. 9. 2023.)
- [13] <https://priroda-vz.hr/vrste/tisa/> (23. 9. 2023.)
- [14] <http://cazma.drvo.kod.eu/tisa/> (23. 9. 2023.)
- [15] <https://www.rootsplants.co.uk/products/common-yew-tree-taxus-baccata> (10. 8. 2023.)
- [16] http://www.botanic.hr/praktikum/Taxus_bacc6.htm (23. 9. 2023.)
- [17] <https://crvenipopis.haop.hr/preglednik/3250> (23. 9. 2023.)
- [18] <https://www.vrtlarica.hr/tisa-sadnja-uzgoj/> (23. 9. 2023.)
- [19] Lj. Grlić, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, 1990.
- [20] <https://www.wildfooduk.com/edible-wild-plants/yew-tree/> (23. 9. 2023.)
- [21] <https://www.flickr.com/photos/109538648@N06/30583514082> (23. 9. 2023.)
- [22] A. Pinto, T. Lemos, I. Silveira, I. Aragão, *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, 33 (2021), 172–175.
- [23] T. Grobosch, B. Schwarze, D. Stoecklein, T. Binscheck, *J. Anal. Toxicol.*, 36 (2012), 36–43.
- [24] M. Krauze-Baranowska, M. Wiwart, *Z. Naturforsch. C.*, 58 (2003), 65–69.
- [25] <https://www.caymanchem.com/product/10012600/myricetin> (21. 8. 2023.)

- [26] Y. Taheri, H. A. R. Suleria, N. Martins, O. Sytar, A. Beyatli, B. Yeskaliyeva, G. Seitimova, B. Salehi, P. Semwal, S. Painuli, A. Kumar, E. Azzini, M. Martorell, W. N. Setzer, A. Maroyi, J. Sharifi-Rad, *BMC Complement. Med. Ther.*, 20 (2020), 241.
- [27] K. Park, Y. Chong, M. K. Kim, *Appl. Biol. Chem.*, 59 (2016), 259–269.
- [28] B. K. S. Hirata, R. M. Banin, A. P. Segantine Dornellas, I. Senna de Andrade, J. Costa Silva Zemdegs, L. Chagas Caperuto, L. Missae Oyama, E. Beraldi Ribeiro, M. Marques Telles, *Mediators Inflamm.*, 2015 (2015), 419106.
- [29] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2226136.htm (21. 8. 2023.)
- [30] M. Caseiro, A. Ascenso, A. Costa, J. Creagh-Flynn, M. Johnson, S. Simões, *LWT*, 127 (2020), 109323.
- [31] R. Schex, W. Bonrath, C. Schäfer, R. Schweiggert, *Food Chem.*, 332 (2020), 127370.
- [32] D. Dumitraş, A. Bunea, D. C. Vodnar, D. Hanganu, E. Pall, M. Cenariu, A. F. Gal, S. Andrei, *Antioxidants*, 11 (2022), 1039.
- [33] R. Chex, F. Schweiggert, B. Wüstenberg, W. Bonrath, C. Schäfer, R. Schweiggert, *J. Agric. Food Chem.*, 68 (2020), 5259–5269.
- [34] H. Khoo, K. N. Prasad, K. Kong, Y. Jiang, A. Ismail, *Molecules*, 16 (2011), 1710–1738.
- [35] A. Mortensen, L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000), 279–286.
- [36] C. S. Boon, D. J. McClements, J. Weiss, E. A. Decker, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50 (2010), 515–532.
- [37] M. Alizadeh-Sani, E. Mohammadian, J. Rhim, S. M. Jafari, *Trends Food Sci. Tech.*, 105 (2020), 93–144.
- [38] A. M. Nurul Aida, A. Shakila, *EKST*, 1 (2021), 132–142.
- [39] https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-lycopene-molecular-formula-and-molecular-weight-5369_fig1_322068055 (22. 8. 2023.)
- [40] D. Zhang, Y. Jiang, M. Xiang, F. Wu, M. Sun, X. Du, L. Chen, *Front. Nutr.*, 9 (2022), 902208.
- [41] Wilson CR, J. Sauer, S. B. Hooser, *Toxicol.*, 39 (2001), 175–185.
- [42] M. R. Lee, *Proc R Coll Physicians Edinb.*, 28 (1998), 569–575.
- [43] <https://www.acep.org/toxicology/newsroom/feb2021/dont-do-the-yew> (23. 8. 2023.)
- [44] L. S. Nelson, M. A. Howland, N. A. Lewin, S. W. Smith, L. R. Goldfrank, R. S. Hoffman, *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, McGraw-Hill, Chicago, 2011.
- [45] <https://www.chemwhat.com/paclitaxel-cas-33069-62-4/> (27. 8. 2023.)
- [46] <https://en.wikipedia.org/wiki/Docetaxel> (27. 8. 2023.)

- [47]<https://www.gla.ac.in/pdf/theory-of-acid-base-indicators.pdf> (11. 8. 2023.)
- [48][https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_\(Petrucci_et_al.\)/17%3A_Additional_Aspects_of_Acid-Base_Equilibria/17.3%3A_Acid-Base_Indicators](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_(Petrucci_et_al.)/17%3A_Additional_Aspects_of_Acid-Base_Equilibria/17.3%3A_Acid-Base_Indicators) (11. 8. 2023.)
- [49]<https://www.thoughtco.com/definition-of-universal-indicator-605761> (11. 8. 2023.)
- [50]<https://support.scientificfilters.com/product-applications/tisch-laboratory-filter-paper/indicator-paper/> (11. 8. 2023.)
- [51]<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/4d903566-3e87-45ae-9299-e35942520b45/kiselo-bazne-reakcije.html> (11. 8. 2023.)
- [52]<https://sciencenotes.org/litmus-paper-and-the-litmus-test/> (12. 8. 2023.)
- [53]<https://sciencing.com/differences-between-litmus-paper-ph-strips-13673.html> (12. 8. 2023.)
- [54]<https://sciencing.com/common-acid-base-indicators-8375206.html> (11. 8. 2023.)
- [55]<https://www.chemicals.co.uk/blog/what-is-methyl-orange> (11. 8. 2023.)
- [56]https://www.profil-klett.hr/system/files/repozitorij/pdf/biljke_kao_kiselo_bazni_indikatori.pdf (11. 8. 2023.)
- [57]https://simplyhealthyvegan.com/does-grape-juice-contain-an-indicator/#google_vignette (21. 8. 2023.)
- [58]https://www.researchgate.net/figure/The-curcumin-color-changes-from-pH-2-13-a-and-the-curcumin-UV-VIS-spectra-at-pH-2-13_fig2_340901522 (21. 8. 2023.)
- [59]https://www.researchgate.net/figure/Curcumin-dissolved-in-different-mediums-A-Curcumin-in-an-acidic-solution-pH-35-and_fig3_334281988 (21. 8. 2023.)
- [60] L. Bertić, Reakcija biljaka na pH vrijednost tla, završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2017.
- [61]<https://agro-planet.net/hortenzija-hydrangea/> (11. 8. 2023.)
- [62]<https://www.lorraineballato.com/changing-the-color-of-your-hydrangeas/> (23. 9. 2023.)
- [63] K. Bilić, Istraživanje biljnog materijala kao potencijalnog kiselo–baznog indikatora, diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2020.