



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÁT
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY
TRADITIO ET EXCELLENTIA

FACULTATEA DE FIZICĂ
Str. Mihail Kogălniceanu nr.1
Cluj-Napoca, RO-400084
Tel: +4(0)264-405300 | FAX: +4(0)264-591906
secretariat.phys@ubbcluj.ro
www.phys.ubbcluj.ro



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Gurghian Vlad Alexandru

2022



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

ANALIZA PROPRIETĂȚILOR ULEIULUI DE SOMON ȘI MONITORIZAREA SCHIMBĂRILOR TEMPORALE CU AJUTORUL IMAGISTICII HIPERSPECTRALE

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Gurghian Vlad Alexandru

Abstract

Introducere

Obiectivul principal al acestui studiu a fost acela de a determina modificările uleiului de somon păstrat la 2 temperaturi diferite pe parcursul a 4 săptămâni de depozitare. Diferențele au fost determinate atât din punct de vedere optic, utilizând microscopie îmbunătățită de câmp întunecat, cât și prin intermediul imaginilor hiperspectrale.

Uleiul de somon este bogat în acizi grași omega-3, care s-au dovedit a avea efecte benefice asupra sănătății organismului prin reducerea riscului de boli de inimă, îmbunătățirea sănătății creierului și reducerea proceselor inflamatorii.

Materiale și metode

Am folosit microscopia în câmp întunecat îmbunătățit și imagistica hiperspectrală CytoViva pentru a monitoriza modificările proprietăților uleiului de somon după expunerea la temperatura camerei (RT) și 4°C pe o perioadă de depozitare de 4 săptămâni. Au fost efectuate două experimente independente: primul a urmărit modificările din aceeași probă timp de 4 săptămâni, iar în al doilea, am pregătit sonde proaspete în fiecare săptămână din uleiul de somon ținut la RT sau 4°C.

Pentru studiul de față am folosit un ulei de somon 100% disponibil comercial, achiziționat în 2022. Pentru fiecare experiment am pus 10 μ L de ulei de somon pur pe lame de microscopie standard și acoperit cu sticlă de acoperire de 0,17 mm grosime, Φ 25 mm.

Rezultate

Optic am observat o cristalizare a probei depozitate la 4°C, în timp ce depozitarea probei la RT nu a modificat constituția optică a acesteia. Am obținut 3 peakuri semnificative cu spectrofotometrie la 473 nm, 566 nm și, respectiv, 588 nm pentru RT. Aceste peakuri au fost deplasate la 473 nm, 568 nm și 591 nm pentru proba de 4°C după 4 săptămâni de depozitare. În plus, am constatat că acesta din urmă a prezentat o creștere de 2 ori a numărului de pixeli în intervalul spectral de 560-600 nm în comparație cu proba menținută la RT atât pentru forma solidă, cât și pentru cea lichidă.

Concluzie

Am demonstrat posibilitatea utilizării imaginilor hiperspectrale pentru controlul calității uleiului de somon păstrat la diferite temperaturi. Astfel, am oferit o dovadă pentru ca această metodă să fie utilizată ca referință pentru a identifica schimbările determinate de mediu în compoziția uleiului de pește.

Abstract

Background

The main objective of this study was to determine the changes of salmon oil kept at 2 different temperatures over 4-week storage. The differences were determined both optically, using enhanced dark field microscopy, as well as by means of hyperspectral imaging.

Salmon oil is rich in omega-3 fatty acids, which have been shown to have beneficial effects on the body's health by reducing the risk of heart disease, improving brain health, and reducing inflammatory processes.

Material and methods

We used enhanced dark field microscopy and CytoViva hyperspectral imaging to monitor the changes in salmon oil properties after exposure to room temperature (RT) and 4°C to over a 4-week storage period. Two independent experiments were performed: the first followed the changes in the same sample for 4 weeks and in the second, we prepared fresh probes each week from the salmon oil kept at RT or 4°C.

For the present study we used a commercially available 100% salmon oil purchased in 2022. For each experiment we put 10 μ L of pure salmon oil on standard microscopy slides and covered with 0.17 mm thick, Φ 25mm cover-glass.

Results

Optically we observed a crystallization of the sample stored at 4°C, while the RT storage did not alter the optical constitution of the sample. We obtained 3 significant peaks with spectrophotometry at 473nm, 566nm and 588nm for RT, respectively. These peaks were shifted to 473nm, 568nm and 591nm for the 4°C sample after 4 weeks of storage. Further, we found that the latter presented a 2-fold increase in the number of pixels in the spectral range of 560-600nm as compared to the sample kept at RT for both solid and liquid form.

Conclusion

We demonstrated the possibility of using hyperspectral imaging for the quality control of salmon oil kept at different temperatures. Thus, we provided a proof for this method to be used as a reference to identify environmental driven changes in fish oil composition.

Cuprins

Introducere	5
Capitolul 1. Imagistica hipersepectrală de câmp întunecat	
1.1 Noțiuni introductive	7
1.2 Sistemul Cytoviva	8
1.3 Componentele sistemului de imagistică hiperspectrală	10
1.4 Cubul de date tridimensional.....	11
Capitolul 2. Uleiul de somon	
2.1 Prezentare generală	13
2.2 Efecte benefice asupra organismului.....	13
2.3 Posibile efecte negative asupra organismului	14
2.4 Caracteristicile unui ulei de somon de calitate.....	15
Capitolul 3. Sinteza datelor din literatura de specialitate asupra uleiului de somon	
3.1 Cromatografierea gazoasă – spectrometria de masă	16
3.2 Spectroscopie în infraroșu apropiat cu transformată Fourier	16
3.3 Spectrometrie de rezonanță magnetică.....	17
Capitolul 4. Materiale și metode	
4.1 Procurarea și pregătirea probelor	19
4.2 Descrierea experimentului.....	19
4.3 Metoda de achiziționare a imaginilor hiperspectrale	21
4.4 Procesarea datelor	25
Capitolul 5. Rezultate și concluzii	
5.1 Experimentul A	28
5.2 Experimentul B	35
5.2.1 Utilizarea spectrofotometrului în studierea spectrului pentru experimental B	35

5.3 Analiza de date privind numărul de pixeli din fiecare ROI	41
5.4 Procesarea de date folosind funcția ” <i>Peak Location Classifier</i> ”	42
Concluzii	46
Bibliografie	48

Introducere

Microscopia în câmp întunecat ca tehnică de microscopie optică este populară în rândul cercetătorilor, mai ales pentru imagistica specimenelor la scara zecilor de nanometri până la ordinul sutelor, chiar miilor de nanometri. În ultimii ani, a apărut o tehnică nouă: microscopia de „câmp întunecat îmbunătățit”, bazată pe utilizarea condensoarelor de lumină cu apertură numerică mai mare și a obiectivelor cu apertură numerică variabilă, ceea ce permite imagistica particulelor la scară inclusiv nanometrică, folosind metodologia de microscopie optică convențională. Imagistica hiperspectrală poate transforma un microscop optic cu câmp întunecat într-un instrument puternic de caracterizare chimică. Acest lucru este datorat faptului că folosind imagistica hiperspectrală, fiecărui pixel din imaginea eșantionului îi este atribuit un cub de date care conține atât informații spațiale, cât și spectrale.

Scopul acestei lucrări constă în analiza proprietăților uleiului de somon și monitorizarea schimbărilor temporale cu ajutorul imagisticii hiperspectrale.

În capitolul 1 prezentăm noțiunile generale care stau la baza celor două tehnici de sine stătătoare și anume imagistica hiperspectrală și microscopia de câmp întunecat, precum și o descriere a sistemului CytoViva, de la componentele sale până la modul de lucru, utilizat pentru măsurătorile efectuate asupra uleiului de somon.

Capitolul 2 prezintă o descriere a produsului examinat: uleiul de somon. Sunt prezentate proprietățile sale și efectele pe care le poate produce dacă este adăugat în dieta alimentară.

Capitol 3 prezintă diferitele metode care s-au utilizat pentru a studia proprietățile uleiului de somon (spectrometrie de masă, spectroscopie NIR, FTIR etc) rezultatele obținute în urma acestor experimente și concluziile la care s-au ajuns în urma acestor cercetări.

Continuând cu capitolul 4 facem o trecere pas cu pas al întregului proces practic al cercetării proprii asupra uleiului de somon, prezentând materialele și metodele de prelucrare utilizate incluzând procurarea probelor, prepararea acestora, aparatura utilizată, parametrii de achiziție a imaginilor și instrumentele de analiză și procesare a informațiilor folosite.

În final, capitolul 5 are scopul de a aduce la cunoștință rezultatele obținute în urma achiziționării imaginilor optice și hiperspectrale a uleiului de somon. Sunt prezentate proprietățile hiperspectrale ale probei împreună cu o comparație amplă ce cuprinde 2 experimente efectuate de-a lungul celor 4 săptămâni în diferite condiții: probe sub formă lichidă păstrate la temperatura camerei, respectiv la 4°C. Evoluția temporală săptămânală a rezultatelor obținute a fost analizată și comparată între ele atât din punct de vedere optic, cât și hiperspectral, exemplificând cu diferențele spectrale-imagistice relevante date de efectul temperaturii de păstrare a probelor.

Capitolul 1. Imagistica hipersepectrală de câmp întunecat

1.1 Noțiuni introductive

Microscopia în câmp întunecat elevată cu imagistică hiperspectrală (HSI) este o nouă metodă optică cu un potențial promițător în disciplinele înrudite biologice, deoarece poate identifica și determina cantitativ componente specifice ale mediului biologic. Metodele optice tradiționale sunt utilizate în mod obișnuit pentru a oferi observații directe și fiabile, dar sunt limitate de rezoluția sistemului optic [1]. În microscopia clasică de câmp luminos iluminarea se realizează prin transmisie și este ideală pentru obiecte care absorb lumina pe un fundal neabsorbant. Acest mod optic ține cont atât de lumina reflectată cât și de cea transmisă, rezultând o rezoluție optică scăzută, un raport semnal-zgomot micșorat și aspectul unui eșantion nefocalizat. În schimb, microscopia în câmp întunecat ia în considerare doar lumina reflectată de pe probă și exclude zgomotul de fond. [2]. Microscopia de câmp întunecat pune la dispoziție un contrast ridicat pentru vizualizarea obiectelor cu contrast redus, care de obicei sunt greu de observat prin microscopia convențională de câmp luminos. Această tehnică utilizează iluminarea indirectă a specimenului atunci când interacționează cu proba, colectând doar lumina reflectată sau împrăștiată elastic de eșantion [3].

HSI este un instrument ce s-a remarcat prin puterea sa și prin extinderea impresionantă atât în domeniul științelor biologice și medicale, dar și în alte domenii unde deține un record dovedit de succes: supraveghere, geostiințe, astronomie, agricultură, managementul resurselor și monitorizarea mediului, printre alte aplicații. Metoda de analiză HSI se bazează pe producerea unui cub de hiperdate cu informații spațiale și spectrale continue ce se obțin dintr-o singură măsurare, fiind o metodă de detecție la distanță și care nu prezintă contact. Cu atât mai mult, metoda actuală este sensibilă la modificările spectrale fine, asigurând o aprofundare a diferențierii entităților biologice sau chimice sau a modificărilor produse de agenții de urmărire în timp [4].

Metodologia imagisticii hiperspectrale cu scanare spațială combinată cu microscopia în câmp întunecat este o modalitate de analiză considerată deosebit de avantajoasă pentru studiile optice ale materialelor la scară nanometrică. Ambele sisteme, atât HSI cât și microscopia în câmp

Gurghian Vlad Alexandru

Analiza proprietăților uleiului de somon și
monitorizarea schimbărilor temporale cu
ajutorul imagisticii hiperspectrale

Întunecat au fost tehnici vast răspândite de ani de zile, însă de curând îmbinarea acestor două metode a apărut într-o tehnică unică. [5]

1.2. Sistemul CytoViva

Microscopia în câmp întunecat îmbunătățește limitele de detecție a imaginilor față de alte tehnici optice utilizate în mod obișnuit. Caracteristica principală prin care microscopul CytoViva se deosebește de microscopul de câmp întunecat clasice este prezența iluminatorului de câmp întunecat îmbunătățit ce dezvoltă performanța și operabilitatea microscopiei în câmp întunecat [6].

CytoViva Enhanced Dark Field Microscopy

Una dintre caracteristicile esențiale pentru care am folosit microscopul de câmp întunecat de la CytoViva este prezența iluminatorului de câmp întunecat îmbunătățit care este proiectat în așa fel încât acesta poate depăși barierele de performanță și cele operaționale specifice opticii standard de câmp întunecat. Aceasta performanță îmbunătățită se realizează prin gestionarea luminii venite de la sursă într-un mod structurat, asemănător microscopiei de câmp întunecat clasice, folosind razele de la periferie pentru a crea conul gol de lumină ce iluminează proba și recoltând doar acele raze de lumină care se reflectă de pe probă. Rezultatul ce se obține este o îmbunătățire a raportului semnal-zgomot de împrăștiere de până la zece ori în comparație cu configurațiile standard de câmp întunecat. Folosind această tehnică de microscopie îmbunătățită putem observa semnalul de la nanomateriale cu dimensiuni începând de la 20 nm, urcând înspre ordinul sutelor de nanometri, astfel incluzând domeniul UV (100 nm -400 nm). [6]

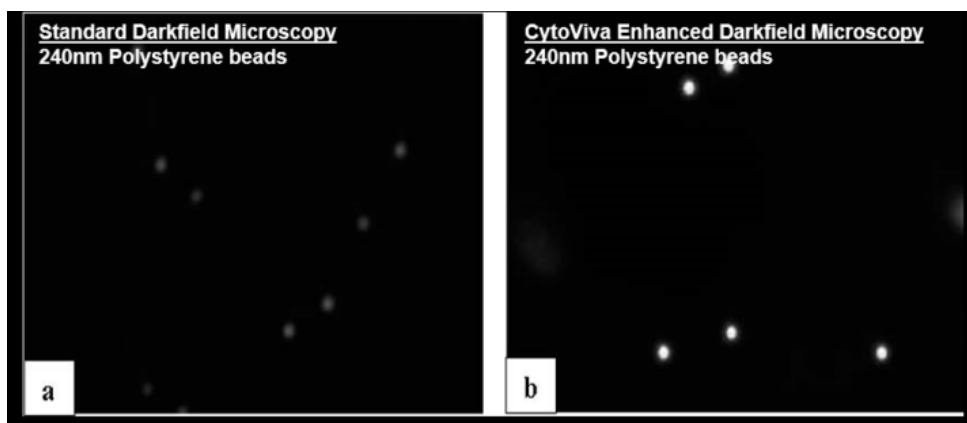


Figura 1.1. Comparație între microscopia standard de câmp întunecat și cea de la CytoViva
(Probă de mărgelile de polistiren de dimensiune 240 nm) [6]

Microscopul de câmp întunecat de la CytoViva oferă optica sa îmbunătățită prin cuplarea luminii sursei direct la condensorul de câmp întunecat prin intermediul ghidajului de lumină. În cadrul sistemului optic CytoViva sunt incluse ansabluri de lentile și oglinzi specializate pentru colimarea fasciolului, care reușesc să alinieze și să fixeze geometria luminii pentru a putea fi compatibilă cu geometria condensorului. Prin urmare, se creează un unghi de lumină extrem de îngust, oblic, care se focalizează cu precizie asupra eșantionului. Astfel, rezultatul obținut este o împrăștiere foarte intensă a mostrelor la scară nanometrică pe un fundal foarte întunecat. Capacitatea de înaltă performanță a sistemului nu numai că oferă utilizatorilor imagini care nu puteau fi achiziționate anterior printr-o microscopie de câmp întunecat clasică, dar permite și altor tehnici de sine stătătoare, cum ar fi microscopia hiperspectrală și Raman, să fie utilizate în combinații inedite [6].

Printre sursele de iluminare care s-au dovedit a fi compatibile cu acest sistem se numără halogenul, mercurul, xenonul sau chiar și laseri, în funcție de aplicație [6].

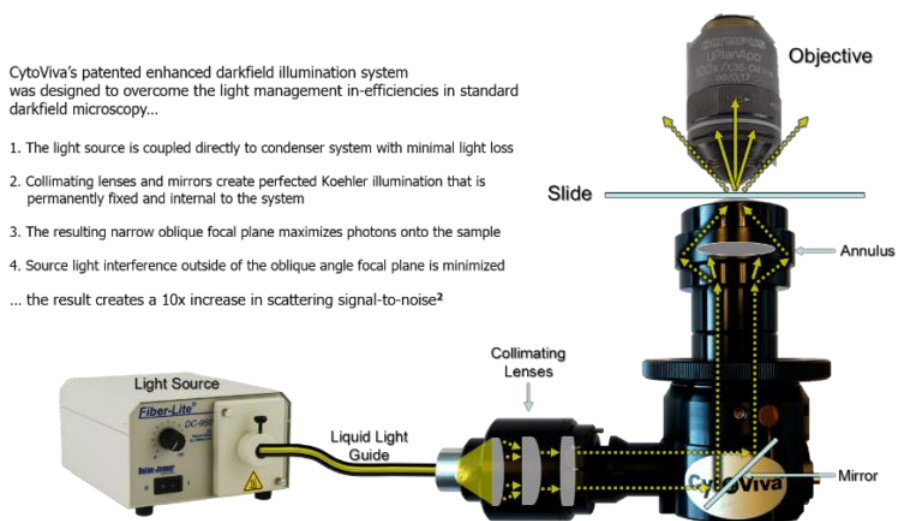


Figura 1.2. Reprezentarea componentelor condensorului îmbunătățit de câmp întunecat și a modului său de funcționare [6]

Nu în ultimul rând, atunci când combinăm capacitatea de imagistică hiperspectrală CytoViva cu cea a iluminării de câmp întunecat îmbunătățite, aceasta nouă metoda de microscopie

cu un raport semnal-zgomot foarte ridicat permite cercetătorilor să caracterizeze și să cartografieze spectral eșantioane într-o gamă largă de medii [6].

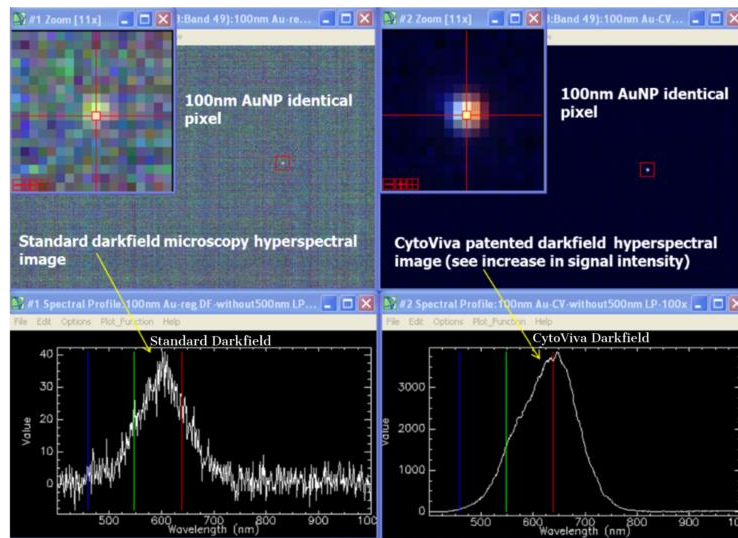


Figura 1.3. Comparație între scanarea hiperspectrală în câmp întunecat standard și cel îmbunătățit de la CytoViva [6]

1.3 Componentele sistemului de imagistică hiperspectrală

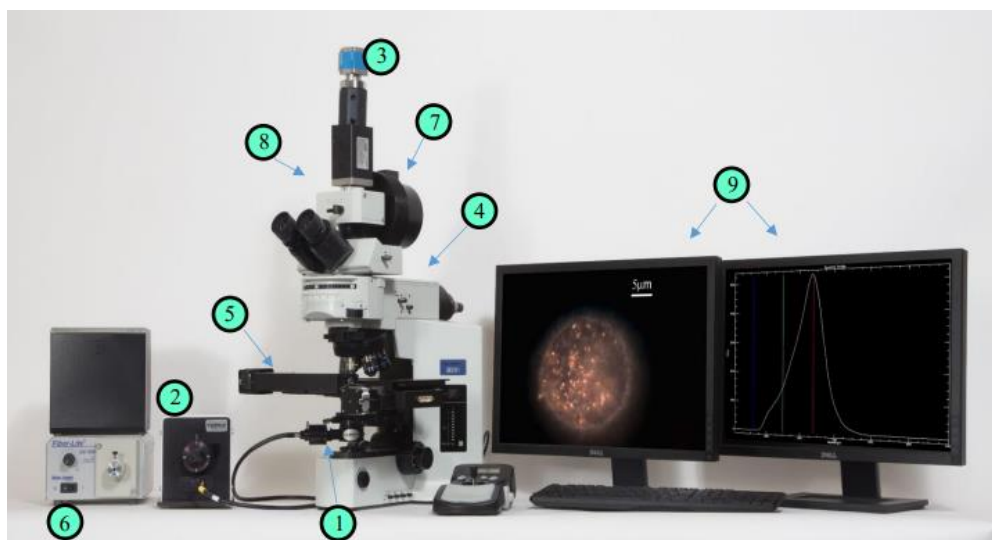


Figura 1.4. Componentele sistemului CytoViva – microscopul hiperspectral cu câmp întunecat îmbunătățit (Hyperspectral Enhanced Dark Field Microscope – HEDFM) [7]

1. Condensorul de câmp întunecat îmbunătățit CytoViva care se află sub masa unde poziționăm proba;
2. Modulul de fluorescență CytoViva;
3. Spectrofotometru VNIR (Visible Near Infra-red) cu cameră CCD integrată ;
4. Microscop Optic – dotat cu ocular de mărime 10x, obiectiv cu mărime de 10x, 40x, respectiv 100x, microviză și macroviză pentru deplasarea mesei pe direcția z și un braț mobil care direcționează lumina fie spre ocular, fie spre spectrofotometru;
5. Masă motorizată pentru probă – se poate mișca în x și y cu ajutorul joystick-ului de control într-un interval spațial de 114 mm x 75 mm;
6. Sursa de lumină reprezentată de o lampă de halogen de putere maximă 150W ce emite radiație electromagnetică în domeniul 400-2500 nm conectată la condensor printr-un ghidaj optic reprezentat de fibră optică;
7. Cameră optică color ce permite vizualizarea specimenului în timp real;
8. Spectrofotometru cu grilă de transmisie în intervalul spectral 400-1000 nm și rezoluție de 2 nm;
9. Software pentru vizualizare, analiza și achiziția imaginilor – ENVI 4.8 care rulează cu ajutorul unui sistem computerizat. [7]

1.4 Cubul de date tridimensional

Achiziția cuburilor de date hiperspectrale oferă date tridimensionale având două coordonate spațiale (x,y) și o dimensiune spectrală (z). Prin urmare, imaginea hiperspectrală este considerată imaginea dată de câmpului întunecat împreună cu informațiile spectrale asociate fiecărui pixel al imaginii. În funcție de rezoluția vizată a metodei, pot fi folosite diferite strategii pentru obținerea cubului de date. În general, metodele care se utilizează în mod obișnuit în HSI pentru trecerea de la o rezoluție mai mare la una mai mică sunt: cartografierea punctelor (“*whiskbroom*”), scanarea în linie (“*pushbroom*”), “scanarea din avion” (“*stare-down*”) și metoda non-scanare (“*snapshot*”) [5]. Achiziția imaginii și pre-procesarea cubului de date pentru analiză implică diferite faze până la formarea unei biblioteci spectrale finale, indiferent de metoda folosită [8]. În mod obișnuit, sistemele HSI care lucrează în spectru vizibil și NIR utilizează cartografierea

prin metoda pushbroom. Generarea hypercubului de date poate dura de la câteva secunde până la minute, în funcție de cum este ajustat timpul de expunere [8].

De obicei, hypercubul de date poate conține sute de mii de pixeli, fiecare având dimensiuni nanometrice. Hypercubul original conține informații nedorite, pixeli care nu răspund și vârfuri (peak-uri) datorate radiației cosmice care se doresc a fi îndepărtate cu grijă. Vizualizarea fundalului imaginii la o lungime de undă care să asigure un contrast favorabil între obiectele de interes și fundal se realizează prin utilizarea tehnicilor de prag (threshold). Figura 1.5 pune într-un rezumat toate procedurile de selecție ale componentelor spectrale finale distribuite în întregul câmp visual. Prin intermediul procedurilor manuale se permite vizualizarea variabilității spectrale într-un eșantion prin compararea spectrelor individuale. În schimb, selecția spectrală folosește instrumente de filtrare a particulelor care permit construcția profilului spectral mediu al unei populații vizate, sau, folosind mijloace de clasificare după dimensiunile pixelilor poate genera spectral subpopulații. [9].

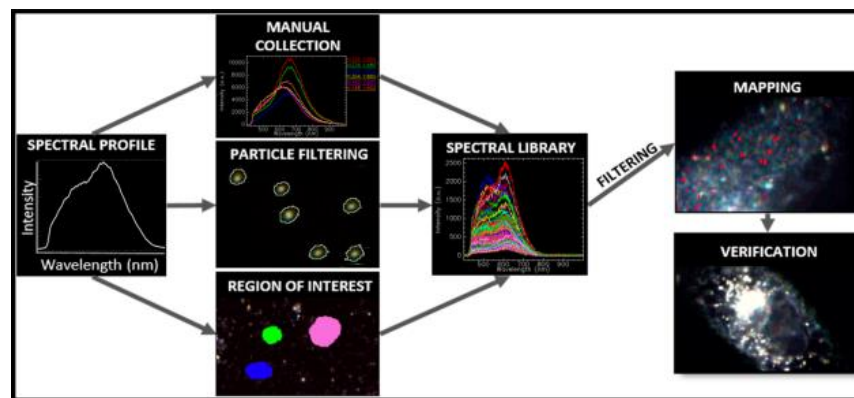


Figura 1.5. Reprezentare a cartografierii datelor precum și a descrierii fluxului de lucru [10].

Figura 1.5 reprezintă o exemplificare a celor două moduri prin care o bibliotecă spectrală poate fi generată: o dată manual, printr-o selecție individuală a profilurilor spectrale dobândite, sau prin intermediul proceselor automatizate folosind instrumentele software care sunt puse la dispoziție. Elementele finale rezultate în urma scanării hiperspectrale și înregistrate în bibliotecă hiperspectrală sunt observate în cuburi de date necunoscute. Acest lucru permite identificarea, spre exemplu, a semnalului nanomaterialelor din matricele biologice. Conversia unui set de pixeli selectați de pe imagine într-o librărie spectrală care poate fi utilizată ulterior într-o analiză prin

mapare se poate realiza cu ajutorul funcției ”*Region of Interest*” – *ROI*. De asemenea, o altă funcție avantajoasă care permite examinarea cantitativă a eșantionului este ”*Peak Location Classifier*”, care poate detecta pixelii dintr-un interval specific, prestabilit de lungimi de undă. [9]

Capitolul 2. Uleiul de somon

Fructele de mare reprezintă una dintre cele mai importante surse de nutrienți care promovează sănătatea, inclusiv unele pe care oamenii le lipsesc din alimentația lor. Cercetările arată că oamenii care mănâncă una sau două porții de pește precum somonul pe săptămână își reduc riscul de boli de inimă cu 36%. [10]

2.1 Prezentare generală a uleiului de somon

Uleiul de somon este obținut din grăsimile peștelui, cunoscute sub numele de acizi grași omega-3. Consumul de ulei de somon este o modalitate de a obține acești nutrienți esențiali dacă nu se consumă în mod frecvent acest tip de pește. [10]

În ceea ce privește tipurile de acizi grași omega-3 conținute de uleiul de somon cei esențiali sunt EPA (acidul eicosapentaenoic) și DHA (acidul docosahexaenoic) care au demonstrat numeroase beneficii asupra condiției de sănătate a organismului, cele mai importante fiind reducerea riscului de boli cardiace, îmbunătățirea sănătății creierului și reducerea proceselor inflamatorii. În următoarele subcapitole vom intra mai în detaliu asupra beneficiilor dar și a potențialelor riscuri ale uleiului de somon. [11]

2.2 Efecte benefice asupra organismului

a) Riscuri reduse asupra bolilor cardiace

Omega-3 din uleiul de somon ajută la reducerea nivelului de trigliceride. Dacă nivelul de trigliceride (un tip de grăsime din sânge) este ridicat în organism, atunci expunerea la riscul de boli de inimă și accidente vascular-cerebrale va crește. Uleiul de somon ajută în schimb la creșterea nivelului de colesterol benefic din organism (HDL – high density lipoprotein) care preia excesul de colesterol care produce afecțiunile cardiovasculară, anume LDL (low density lipoprotein) din sânge și îl duce la ficat unde este descompus și eliminat din organism. [10]

b) Reducerea riscului de boli cronice

Acizii grași omega-3 din uleiul de somon au proprietăți anti-inflamatorii. Chiar dacă inflamația este răspunsul natural al organismului la stres și infecții, nivelurile ridicate cresc

în timp predispunerea la boli cronice, inclusiv cancer, diabet și artrită. Ajutând la reducerea inflamației, cercetările arată că o dietă bogată în omega-3 poate ajuta la protejarea împotriva acestora și a altor boli legate de inflamație. [10]

c) Îmbunătățirea circulației vasculare

Un studiu a constatat că omega-3 din uleiul de somon poate îmbunătăți fluxul sanguin al corpului și circulația oxigenului. Alte surse de omega-3 s-au dovedit a avea un efect mult mai redus în comparație cu cel al uleiului de somon. În urma unor cercetări s-a demonstrat faptul că organismul convertește omega-3 în oxid nitric, un compus chimic care ajută vasele de sânge să rămână relaxate și flexibile, dar rezistente. [10]

d) Suportul cognitiv

Uleiul de somon s-a dovedit a fi una dintre sursele cu un conținut ridicat de DHA. Mai multe cercetări efectuate în stabilirea efectului DHA asupra organismului au arătat că acesta ajută la repararea și menținerea structurii celulelor creierului. Aportul suficient din acest acid gras în dietă poate reduce riscul de declin cognitiv, inclusiv afecțiuni precum boala Alzheimer și Parkinson. [10]

e) Menținerea sănătății vederii

Tot din cauza conținutului ridicat de omega-3, uleiul de somon poate susține și sănătatea ochilor. Pentru a susține această ipoteză, s-au efectuat o multitudine de studii care au arătat că afecțiunilor oculare precum glaucomul și pierderea vederii datorată vârstei le poate fi redus riscul de apariție prin consumul regulat de suplimente de ulei de somon bogat în omega-3. [10]

2.3 Posibile efecte negative asupra organismului

Suplimentele de ulei de somon sunt de obicei sigure. Totuși consumul de ulei de somon poate fi însoțit de anumite riscuri precum:

a) Contaminarea cu metale grele

Toate fructele de mare au un anumit risc de contaminare de la toxine precum metalele grele prezente în apă. Studiile au descoperit doar cantități mici sau urme în uleiul de somon, dar numai dozele mari pot cauza probleme grave de sănătate. Aceste cazuri sunt

totuși rare întrucât uleiul este supus unor procese de purificare performante. Aceste riscuri pot apărea din cauza mărimii populației de somoni din care se extrage uleiul și din cauza vitezei de producție setat de fiecare producător. Este posibil ca o viteză mare de producție a uleiului să atragă după sine posibile erori în fabricarea lui. De aceea, unele cercetări sugerează că somonul de crescătorie poate avea un risc mai mic de contaminare comparative cu cel din acvaculturi. [10]

b) Discomfort gastric

În cantități mari, suplimentele de omega-3 precum uleiul de somon pot provoca arsuri la stomac, greață și diaree. Astfel, el trebuie consumat conform specificațiilor. [10]

2.4 Caracteristicile unui ulei de somon de calitate

- a) Un ulei de somon de calitate nu este diluat cu alte uleiuri vegetale sau provenite de la alți pești. În unele cazuri, ceea ce este etichetat drept ulei de somon este de fapt un amestec cu alte tipuri de uleiuri cu scopul doar de a ridica nivelurile de omega-3. [12]
- b) La fabricarea uleiului de somon se utilizează o tehnologie care permite conservarea prospețimii și îl protejează împotriva radicalilor liberi și a oxidării. Majoritatea uleiurilor de pește nu oferă acest lucru, drept pentru care pot suferi probleme de oxidare și alterare. Un studiu recent din Norvegia a constatat că 95% din cele 113 mărci de ulei de pește erau rancede. [12]
- c) Oferă acei acizi grași esențiali, anume EPA și DHA care constituie principalul beneficiu în consumul de ulei de somon. [12]
- d) Procesele de producție rețin nutrienții vitali – Unele procese de ulei de pește folosesc căldură excesivă, procesare chimică și/sau extracție cu solvenți - schimbând potențial structura și calitatea uleiului. [12]
- e) Producătorul are un proces de purificare de înaltă calitate pentru detectarea și filtrarea toxinelor comune de pește, cum ar fi mercurul, PCB-urile, metalele grele și alte toxine -- Aceasta este o problemă persistentă cu majoritatea uleiurilor de pește întrucât reziduurile toxice din peștii crescuți în masă pentru o producție a uleiului rapidă poate conduce la eronarea sistemului de purificare ce duce la coborârea standardului de calitate al uleiului. [12]

Capitolul 3. Sinteza datelor din literatura de specialitate asupra uleiului de somon

3.1 Cromatografie gazoasă combinată cu spectrometrie de masă

O metodă de cromatografie gazoasă combinată cu spectrometrie de masă a fost optimizată și aplicată pentru a profila acizii grași esterificați majori în opt specii de icre de pește liofilizate și trei capsule de ulei de pește comercializate. În icrele și mostrele de ulei de pește s-au identificat 20 de acizi grași majori esterificați. Pentru uleiul de somon sălbatic, uleiul de somon de apă rece și capsulele de ulei de ficat de cod s-au măsurat următoarele cantități de acizi grași esterificați: 235.5, 145.8, respectiv 195.5 mg/g. Însă, acizii grași esterificați din speciile de icre de pește au avut o variație a cantității totale cuprinsă între 40 și 61 mg/g. Folosind statistica în componente principale, datele de cuantificare obținute au arătat o valoare caracteristică a scorului pentru fiecare tip de icre de pește. În icrele de somon și icrele de pește Mosa s-a găsit cea mai mare concentrație de omega-3 esterificat: 15.34 mg/g, respectiv 13.15 mg/g. De asemenea, pentru acidul α -linolenic esterificat, acidul eicosapentaenoic (EDF) și acidul docosahexaenoic (DHA), cantitățile maxime ale acestora s-au găsit în uleiul de somon sălbatic (7.73 mg/g), icre de pește de somon (6.09 mg/g) și, respectiv, icre de pește Mosa (11,00 mg/g). [13]

3.2 Spectroscopie în infraroșu apropiat cu transformată Fourier

Un spectrometru cu transformată Fourier în infraroșu apropiat (FT-NIR) poate fi folosit pentru achiziția spectrelor de transmisie ale unor probe de ulei de somon. În cazul metodei citate din articolul de referință, acest instrument este echipat cu o sursă NIR, un divizor de cuarț și un detector PbS. Spectrele de transmisie NIR ale uleiurilor de somon măsurate variază între 14.000 și 4500 cm^{-1} . Prin efectuarea a 50 de scanări folosind o rezoluție optică de 4 cm^{-1} a fost posibilă dobândirea fiecărui spectru. Prin folosirea unei cuve goale de sticlă în aceleași condiții instrumentale ca acelea utilizate pentru măsurătorile probelor, s-a obținut spectrul de fond care s-a dorit a fi eliminat pentru determinarea spectrului caracteristic al uleiului. Pentru o precizie mai bună a determinării acestui spectru, s-au efectuat câte trei măsurători pentru fiecare probă prin rotirea poziției flaconului cu proba. [14]

Figura 3.1 exemplifică rezultatele spectrale NIR ale tuturor probelor de ulei de somon luate în considerare prin acest studiu. Benzile de absorbție în jur de 8560 și 8261 cm^{-1} sunt asociate cu vibrațiile de întindere ale CH_3 și respectiv CH_2 , în timp ce cele de la 7181 și 7065 cm^{-1} se datorează benzii combinate de C-H. Vârfulurile la 5792 și 5676 cm^{-1} iau naștere din vibrațiile de întindere ale grupurilor $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ și $-\text{HC}=\text{CH}$. Vârfulurile mici de la 4654 cm^{-1} sunt asociate cu benzi combinate de vibrații de întindere C-H și C-O. [14]

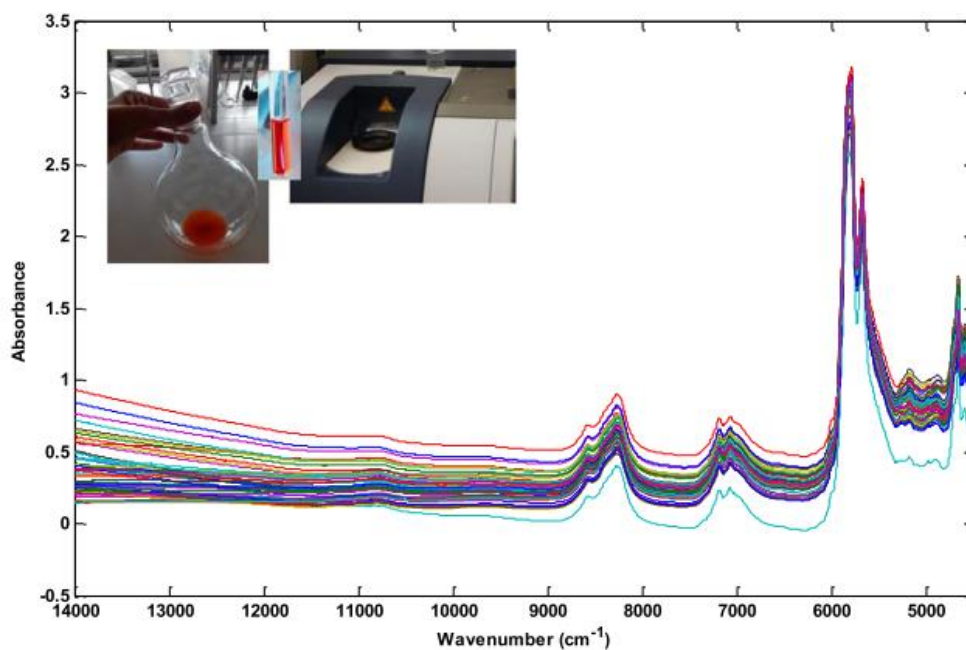


Figura 3.1. Spectrele NIR ale probelor de ulei de somon extrase în regiunea între 14.000 și 4500 cm^{-1} fără nicio prelucrare a datelor [14]

3.3 Spectrometria de rezonanță magnetică nucleară

Folosind un spectrometru de rezonanță magnetică nucleară cu protoni de 500 MHz (^1H RMN), s-a dezvoltat o metodă cantitativă pentru determinarea conținutului de acid docosahexaenoic (DHA) în uleiurile de pește (mg/g), a proporțiilor molare (% molar de DHA la toți alți acizi grași care compun uleiurile de pește și proporțiile molare ale totalului de acizi grași omega-3 față de toți ceilalți acizi grași non-omega-3 din uleiurile de pește. După examinarea caracterului adecvat al etilenglicol-dimetil-eter (EGDM), metanol și 1,4-dioxan ca standarde

interne, condițiile în care s-a efectuat experimentul au fost eficientizate prin utilizarea cu preponderență a EGDM ca standard intern. Prin stabilirea timpului de repetare a pulsului la 30 s, s-a obținut o bună reproductibilitate a datelor și timp analitici mai mici de 10 min. De asemenea, standardul intern s-a utilizat pentru cuantificarea DHA pe bază de greutate (mg/g). Un studiu interlaborator între Japonia și Norvegia pe uleiuri de bonito, ton și somon a permis verificarea acestei metode. Pentru cuantificarea DHA, pentru proporția molară de DHA și pentru proporția molară a totalului de acizi grași omega-3, erorile relative în datele ^1H RMN dintre Japonia și Norvegia au fost de 0.57–5.29%, 0.7–2.09%, respectiv 0.1–1.41%. Pe baza erorilor relative menționate anterior s-a observat o corelare bună între datele ^1H RMN și cele obținute prin cromatografie gazoasă (GC). Pentru pregătirea probei înainte de măsurătorile ^1H RMN s-au parcurs două etape: cântărirea probei și prepararea unei soluții standard interne. Metoda ^1H RMN propusă a fost considerată a fi o alternativă promițătoare la metoda GC în cuantificarea DHA și acizii grași omega-3 din uleiurile de pește, datorită reproductibilității ridicate, simplității procedurii și a clarității principiului.[15]

Capitolul 4. Materiale si metode

4.1 Procurarea și pregătirea probelor

Pentru a se atinge obiectivul lucrării, a fost utilizată o singură sursă de ulei de somon comercializată în supermarketuri, achiziționată în februarie 2022. Este de menționat ca un criteriu pe care a trebuit să îl îndeplinească proba pe care dorim să o analizăm este să aibă 100% conținut ulei de somon. Fiind ulei de somon pur, conține acizii grași omega-3 esențiali în proporție de 15% la cantitatea de 300 mL, din care EPA – 3.5% , DHA – 5.5% și restul de 6% alți acizi grași conform specificațiilor de pe eticheta produsului.

Pentru pregătirea probelor s-a folosit un proces de prelucrare standard pentru fiecare dintre acestea. Pe fiecare lamelă pe care am efectuat măsurători, am depus o picătură de ulei de somon de 10 μ L cu ajutorul unei micropipete. Pentru a obține o suprafață extinsă a acelei picături astfel încât să avem regiune largă de analiză a probei, am acoperit picătura cu un “cover-glass” cu diametru de 25 mm și adâncime de 0.17 mm. În unele cazuri, pentru a conserva proba pe o durată de timp mai lungă, de câteva săptămâni, am sigilat-o cu lac pentru a preveni evaporarea uleiului.

4.2 Descrierea experimentului

În cadrul lucrării s-au realizat 2 experimente. Este de menționat că în cadrul acestor experimente scopul nu a fost analiza particulară a acizilor grași omega-3 esențiali din proba de ulei de somon, din cauză că studiile precedente au arătat că spectrul de excitare/emisie al EPA și DHA este situat în domeniul spectral UV (între 180 și 300 nm), iar sistemul CytoViva operează într-un domeniu spectral în vizibil și infraroșu apropiat (400nm-1000nm). Așadar ne vom rezuma la experimentele tip analiză în timp a două probe de ulei de somon ținute în condiții de temperatură diferite. [16]

Primul experiment a presupus ca lamelele preparate așa cum am descris în subcapitolul precedent (în cazul acestui experiment trebuie să fie sigilate cu lac) să fie ținute fiecare la temperaturi diferite: una la temperatura camerei –23 °C (RT) și una la frigider - 4°C. Aceste lamele le-am comparat pe parcursul a 4 săptămâni și le-am studiat diferențele atât de structură cât și spectrale prin scanarea hiperspectrală a sistemului CytoViva.

Al doilea experiment, asemănător cu primul, a constat în comparația uleiului de somon ținut în aceleași două condiții de temperatură diferite, însă comparativ cu primul experiment, în loc de analiza aceleiași lamele în cazul fiecărei probe, am pregătit câte o lamelă nouă cu ulei în fiecare săptămână. Uleiul din care în fiecare săptămână am luat mostre pentru a face lamele noi l-am depozitat în tuburi Eppendorf.

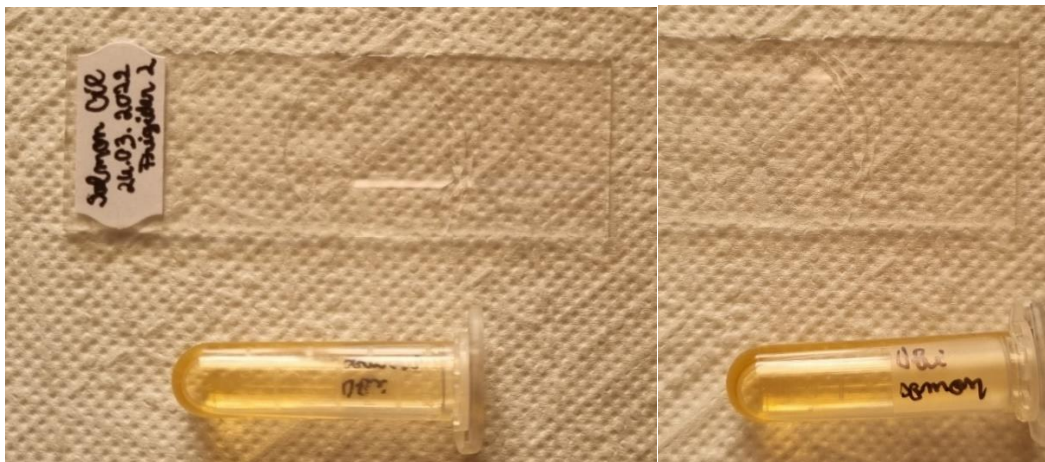


Figura 4.1. A) – Proba de ulei de somon – În partea superioară avem proba solidă pentru păstrată la 4°C pentru experimentul 1 și în cea inferioară avem proba lichidă păstrată la 4°C într-un tub Eppendorf

B) Proba de ulei de somon – În partea superioară avem proba solidă pentru păstrată la RT pentru experimentul 1 și în cea inferioară avem proba lichidă păstrată tot la RT într-un tub Eppendorf

Pentru fiecare experiment în fiecare săptămână și de pe fiecare lamelă s-au achiziționat 3 imagini hiperspectrale cu obiectivul de mărire $40\times$, Plan-Fluo, NA 0.6, setând intensitatea luminoasă pe probă în funcție de nevoia de obține un raport semnal-zgomot cât mai satisfăcător, lucru pe care îl vom aprofunda în subcapitolul următor. Astfel am obținut 6 imagini pentru experimentul 1 (3 imagini de pe proba la RT și 3 imagini de pe proba ținută la 4°C) și 6 imagini experiment 2 (achiziția de imagini se face identic cu experimentul 1) în fiecare săptămână.

Tabel 4.1. Caracteristici ale experimentului și condiții de păstrare a probelor

T(°C)	SET 1 – Lamelele 1 și 2 sigilate					SET 2 - Proba lichida din eppendorf				
23	S0	S1	S2	S3	S4	S0	S1	S2	S3	S4
4	S0	S1	S2	S3	S4	S0	S1	S2	S3	S4

În tabelul 4.1 am trecut desfășurarea măsurătorilor pe parcursul celor 4 săptămâni. Compararea probelor se face atât pe direcția longitudinală, cât și pe cea transversală.

Analiza longitudinală se referă la faptul că vom observa diferențele în timp a probelor ținute la aceeași temperatură, atât în cazul experimentului 1 cât și în cazul experimentului 2.

Analiza transversală se referă la faptul că se vor studia diferențele între probele ținute la temperaturi diferite din fiecare săptămână. Această analiză se realizează pentru ambele experimente.

Iar la final se va face o comparație între cele 2 experimente pentru a discuta eventualele rezultate obținute în urma diferenței procesului de analiză la care am supus probele.

4.3 Metoda de achiziționare a imaginilor hiperspectrale

Imaginile hiperspectrale sunt create printr-o scanare liniară sau de „tip pushbroom”, care constă în deplasarea probei pe câmpul vizual al microscopului și spectrografului printr-o mișcare de translație automată a microscopului. Pentru crearea acestor imagini hiperspectrale este nevoie de secunde sau minute, în funcție de expunerea necesară. Sistemul de imagistică hiperspectrală bazat pe microscopie este format dintr-o sursă de lumină specializată, un stadiu de translație automatizat, un spectrograf cu grătar de transmisie a difracției și o cameră. Aceste componente sunt integrate și lucrează împreună cu un software de captare și analiză a imaginilor, care oferă posibilitatea de a compara spectrele dintr-o imagine din eșantion sau de a le compara între un număr mare de probe. De asemenea, software-ul poate construi o bibliotecă spectrală de elemente din probe unice. Folosind apoi această bibliotecă spectrală, elementele de probă pot fi apoi localizate în probe ulterioare. [7]

Din punct de vedere practic, pentru a putea achiziționa imagini hiperspectrale avem nevoie de softul ENVI 4.8. Pentru achiziția imaginii hiperspectrale se urmează următorii pași: se deschide Softul ENVI 4.8, se selectează tab-ul CytoViva HSI Microscope Controls, iar în urma selecției se va deschide interfața grafică CytoViva HSI Microscope Controls (Figura 10) [7]

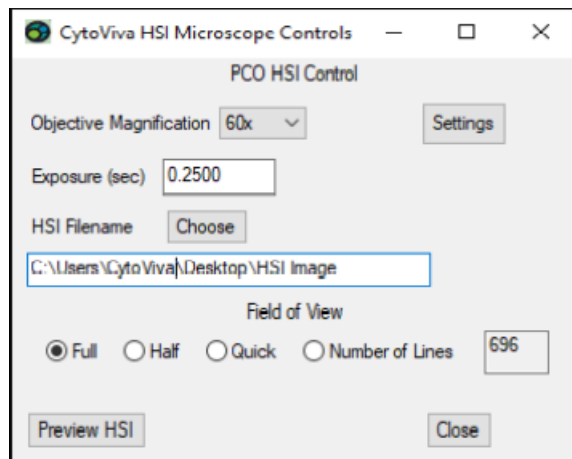


Figura 4.2. Fereastra de control a microscopului CytoViva [7]

Interfața grafică de control a microscopului hiperspectral CytoViva dispune de câteva setări care sunt vitale pentru achiziționarea imaginii hiperspectrale corect. În primul rând trebuie să selectăm obiectivul corespunzător cu care am achiziționat imaginea în câmp întunecat și cu care urmează să scanăm eșantionul, astfel ca cele 2 imagini, cea în câmp întunecat și cea hiperspectrală să poată fi corelate. Opțiunile de care dispune softul sunt obiective de 10x, 20x, 40x, 50x, 60x, 100x. Apoi trebuie să selectăm timpul de expunere dorit (în secunde). Timpul de expunere reprezintă durata de timp pe care noi o alocăm camerei hiperspectrale să colecteze lumina de la probă pentru a efectua scanarea. Nu în ultimul rând trebuie selectat câmpul vizual, unde avem 4 variante posibile pentru scanare:

1. Scanare completă (full) – scanarea va produce o imagine cu înălțime și lățime egale
2. Scanare pe jumătate (half) – scanare a $\frac{1}{2}$ din imaginea totală
3. Scanare rapidă (quick) – scanare a unui număr de 21 de linii
4. Scanare a unui număr de linii stabilit de utilizator [7]

După ce am urmat pașii necesari pentru a putea începe scanarea, vom selecta fereastra de previzualizare care are rolul: de a confirma poziționarea obiectelor în câmpul de scanare, de a ajuta la ajustarea focusului și de a confirma ca expunerea camerei este adecvată. [7]

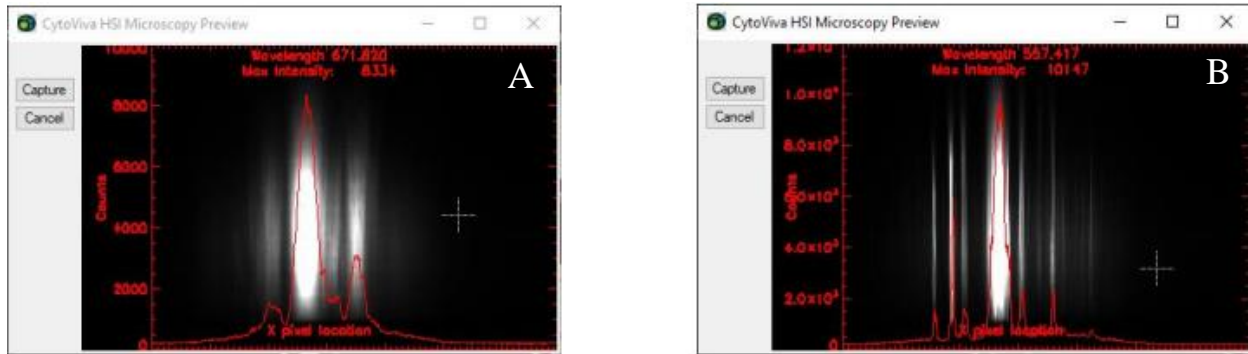


Figura 4.3. Fereastra de previzualizare CytoViva unde peak-urile ne indică faptul că

A) imaginea nu este focalizată

B) imaginea este focalizată

După ce ne-am asigurat că avem un semnal satisfăcător și anume undeva în intervalul 800-1000 pentru intensitatea maximă cu un zgomot de până la 200 (oferindu-ne astfel un raport semnal-zgomot de 4-5 care este bun), putem apăsa pe butonul „*Capture*” așa cum apare în figura 11 pentru a începe scanarea. Va apărea o fereastră care arată cum cubul de date este construit în timp real și de asemenea asociat lui va apărea și un grafic al intensității spectrale. Masa se poziționează la începutul zonei de scanare și apoi liniile individuale ale imaginii HSI sunt dobândite, până când masa se mută la capătul zonei de scanare. După ce scanarea este finalizată, imaginea se deschide automat în software-ul ENVI 4.8 ca o recreere într-un format RGB bazată pe intensitatea spectrală măsurată la fiecare pixel care se suprapune cu zona de interes din probă (Figura 4.4.). Sunt înregistrate toate spectrele punctelor din imagine, care pot fi exportate pentru o analiză ulterioară sau salvate sub formă de fișiere. [7]



Figura 4.4. Fereastra ce ilustrează crearea în timp real a cubului de date tridimensional

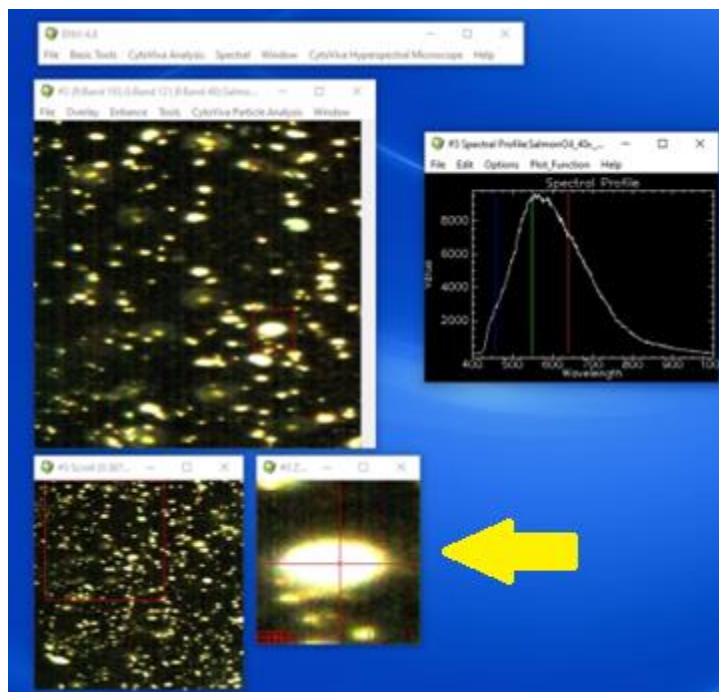


Figura 4.5. Imaginea hiperspectrală finală obținută împreună cu un zoom pe o particulă de ulei de somon (săgeată) și spectrul asociat particulei respective (partea dreaptă sus)

4.4 Procesarea datelor

Următoarea etapă în îndeplinirea obiectivului acestui studiu a reprezentat-o procesarea datelor pe care le-am obținut după achiziția imaginilor hiperspectrale. În această etapă a măsurătorilor am utilizat una din opțiunile softului ENVI 4.8 și anume „*Region Of Interest*” („*ROI Tool*”). Această unealtă ne permite să selectăm o serie de pixeli din diferite regiuni ale imaginii hiperspectrale și să măsurăm spectrul mediu al pixelilor selectați de pe probă. În cadrul experimentelor noastre, am folosit *ROI Tool* pentru a marca pe fiecare imagine hiperspectrală câte 5 regiuni aleatorii unde aveam proba. Marcarea se face fie prin formele de care dispune softul (în general poligoane diverse) dar se poate face și prin desenarea liberă a regiunii pe care dorim să o studiem, cu ajutorul cursorului. În momentul în care începem să folosim *ROI Tool*, o fereastră se va deschide unde ne sunt afișate toate regiunile selectate. În aceasta fereastră, fiecărei regiuni îi corespunde un număr (*Region 1*, *Region 2* etc.) , o culoare prin care să o distingem de restul ROI (*red, green, blue, yellow, cyan* etc...) pe imaginea hiperspectrală și de asemenea, poate cea mai importantă informație, numărul de pixeli selectați cu ajutorul cărora s-a făcut medierea spectrelor.



Figura 4.6. Fereastra de zoom din softul ENVI 4.8 cu regiunile de interes marcate prin cecuri de diferite culori (roșu, verde, respectiv albastru) [7]

Fiecare ROI are înregistrat un anumit spectru pe care îl generează din pixelii selectați care dispun de informația în format RGB a cubului de date tridimensional codificată de poziția lor. În urma selecției celor 5 ROI pe imaginea hiperspectrală, din opțiunile ferestrei *ROI Tool* am unit

regiunile (cu funcția “*Merge Regions*”) sub o singură regiune finală pentru care am studiat spectrul mediu. Acest spectru mediu l-am obținut prin selectarea din fereastra *ROI Tool* a opțiunii “*Stat*” care îl calculează automat pentru cele 5 regiuni. Acest spectru l-am extras într-o fereastră de plotare nouă, după care să l-am salvat sub formatul ASCII ca și document text pentru încă o prelucrare a datelor ulterioară.

Așadar, la finalul acestei prime părți pe care am operat-o din softul ENVI am obținut pentru fiecare imagine un spectru mediu. Pentru fiecare experiment am achiziționat câte 3 imagini pentru fiecare probă ținută în cele 2 condiții de temperatură diferite la 4 săptămâni. Astfel, pentru fiecare probă avem pe săptămână câte 3 ROI care la rândul lor au trebuit a fi mediați într-un spectru final care l-am utilizat la compararea rezultatelor. În fiecare fișier text obținut avem 2 coloane cu date numerice: prima coloană este axa O_x ce conține fiecare punct din domeniul spectral pe care poate lucra sistemul (400 – 1000 nm) și axa O_y conține intensitățile pixelilor. În continuare am transpus aceste date într-un program de plotare de grafice pentru a obține un spectru mediu al celor 3 poze de pe fiecare probă. Programul de plotare utilizat pentru seturile de date a fost Microsoft Excel 2016. Caracteristicile principale pentru care am utilizat acest program sunt: interfața grafică ușor de utilizat și intuit care a redus timpul de calcul și plotare a datelor, varietatea de care dispune în materie de tipuri de grafice și funcția particulară care detectează automat care este cel mai optim grafic de utilizat pentru seturile de date care urmează a fi plotate. La final am obținut pentru fiecare experiment 5 spectre pentru proba ținută la RT și 5 spectre pentru proba ținută la 4°C, fiecare spectru corespunde medierii tuturor datelor recoltate de la fiecare sesiune de măsurători.

În pasul următor s-a utilizat din softul ENVI 4.8 funcția “*Peak Location Classifier*” pentru determinarea pixelilor localizați la o anumită lungime de undă. Pentru numărarea pixelilor și stabilirea unui procentaj al pixelilor localizați la lungimile de undă indicate s-a utilizat softul ImageJ v.1.53k. Imaginea ce conține pixelii localizați a fost convertită în format binar, adică din totalul de pixeli de pe imagine, pixelii localizați au fost marcați în culoarea neagră, iar restul pixelilor în culoare albă. După această conversie, s-a folosit o histogramă pentru citirea numărului de pixeli localizați și a numărului de pixeli total din imagine. Procentajele s-au calculat prin împărțirea numărului de pixeli localizați la numărul de pixeli total.

4.5 Analizarea uleiului de somon cu ajutorul spectrofotometriei

În cadrul măsurătorilor, ca și o anexa la celelalte 2 experimente efectuate, s-a realizat un al treilea experiment suplimentar asupra uleiului de somon și anume s-a măsurat spectrul caracteristic al celor 2 probe lichide ținute în condiții de temperatură diferite, cu ajutorul unui spectrofotometru.

Am folosit un LED pe care l-am montat pe spectrofotometru, urmând ca mai apoi să punem spectrofotometrul în poziția în care măsurăm probă cu lumină în transmisie și să îl conectăm la compartimentul unde plasăm proba.

Din tuburile Eppendorf cu cele 2 probe lichide ținute la RT, respectiv la 4°C am extras cu ajutorul unei micropipete de 100 – 1000 μL o cantitate de 300 μL din fiecare pe care am transferat-o în cuve. Pentru a măsura spectrul caracteristic al uleiului de somon pentru fiecare probă, am plasat cuvele cu ulei în compartimentul care izolează proba de restul radiației venite din exterior. Acest compartiment este conectat la un computer printr-o fibră optică, iar cu ajutorul softului SpectraWiz am putut măsura spectrul uleiului, pe care l-am salvat ulterior în format ASCII pentru o vizualizare ulterioară. S-a măsurat și salvat pe rând proba de la RT, respectiv proba la 4°C.

Pentru partea de analiză de date a acestui experiment s-a folosit ca și program de plotare a datelor, OriginLab 2022, unde am încărcat graficele și normalizat pentru a le putea compara.

5. Rezultate

Capitolul 5 reprezintă centrul de interes al acestei lucrări întrucât cuprinde atât rezultatele obținute în urma efectuării experimentelor cât și diferențele ce le-am putut observa și de pe urma cărora am putut trage anumite concluzii referitoare la efectele pe care le-au avut timpul și condițiile de păstrare asupra uleiului de somon.

5.1 Experimentul A

Începem prin a expune rezultatele experimentului 1 prin exemplificarea acestora printr-o imagine în transmisie a uleiului de somon din S0 la RT. Imaginea a fost achiziționată cu obiectivul de mărire 10x, iar intensitatea sursei de lumină a fost setată la jumătate din puterea maximă. Nu este necesară atașarea unei imagini de la 4°C deoarece în S0 nu există diferențe între probe.



Figura 5.1. Proba solidă de ulei de somon în S0 la RT – mărire obiectiv 10x – intensitate luminoasă 50%

În urma analizei cu ajutorul softului ENVI 4.8 folosind *ROI Tool* am obținut spectrele medii de pe fiecare imagine hiperspectrală. Pentru fiecare imagine am importat în Microsoft Excel

2016 datele fiecărui spectru pentru a le media într-un spectru final pentru fiecare săptămână de măsurători, pentru fiecare dintre cele 2 probe – la RT, respectiv 4°C.

În figura 14 am inclus un exemplu al analizei ROI care s-a făcut pentru fiecare imagine hiperspectrală la RT, respectiv 4°C. Pe baza datelor obținute și salvate în format ASCII s-au putut calcula spectrele medii prin medierea intensității pixelilor.

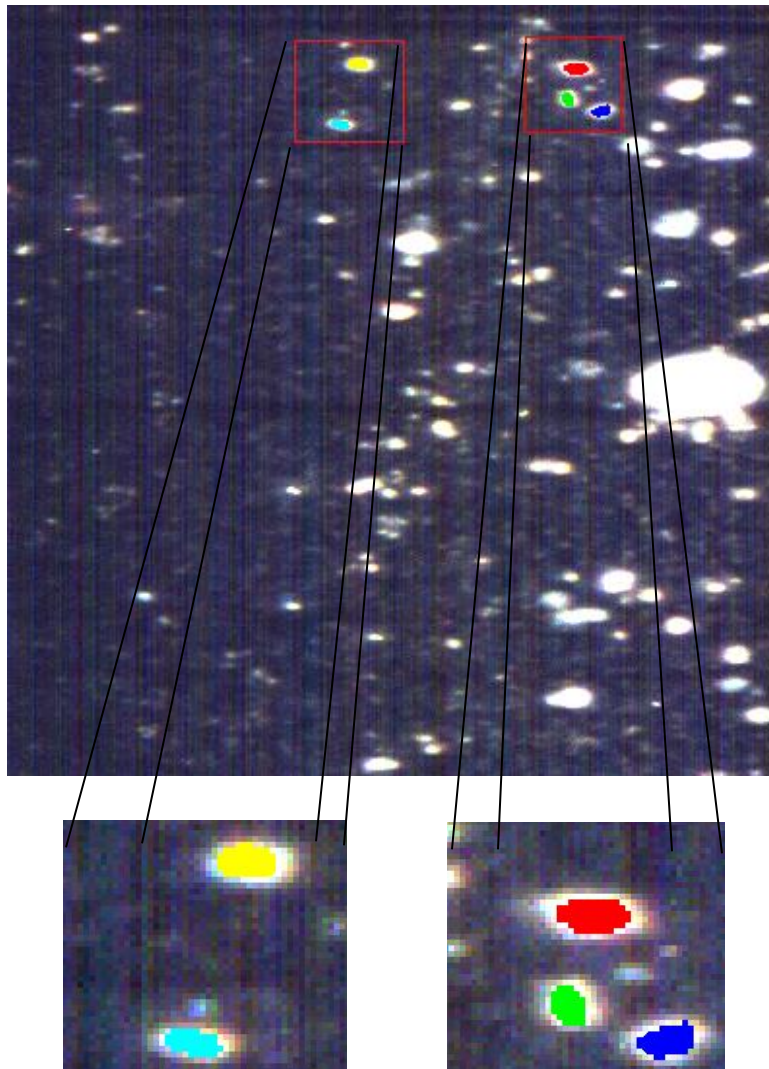


Figura 5.2. Exemplu al unei imagini hiperspectrale de ulei de somon pe care s-a efectuat analiza
ROI

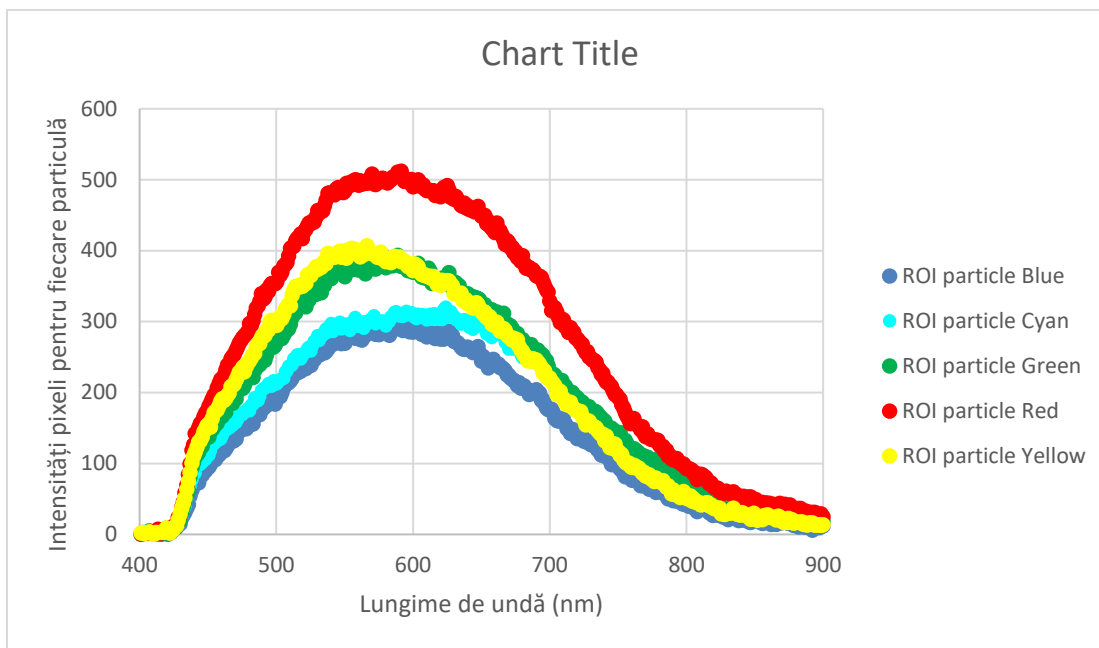


Figura 5.3. Exemplu al unei reprezentări grafice ale spectrelor obținute de pe fiecare particulă folosind analiza ROI

Astfel pentru proba la RT pentru S0 am obținut ca spectru mediu (Figura 14A). Respectiv, pentru proba la 4°C în S0 am obținut următorul spectru (Figura 14B):

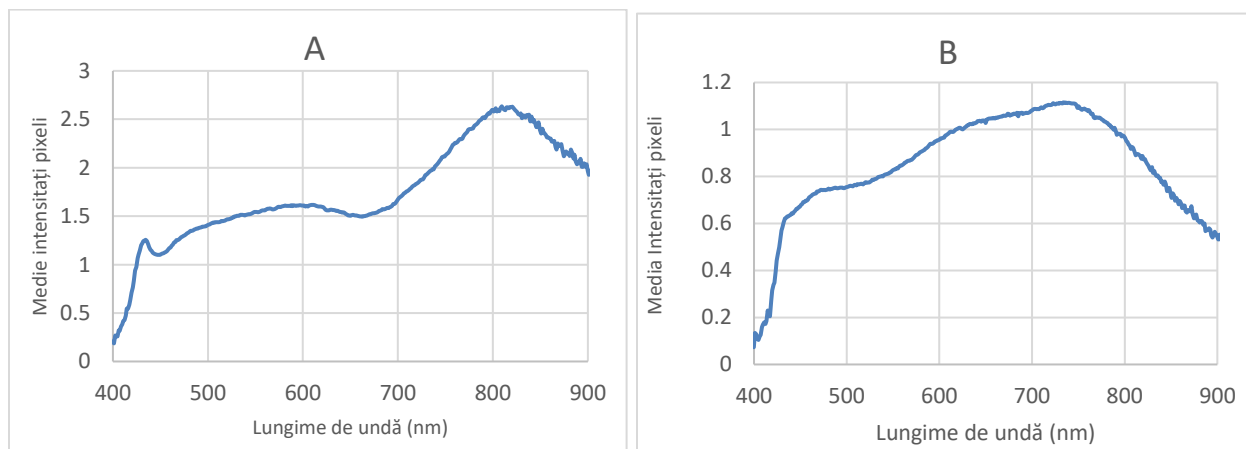


Figura 5.4. Spectrele medii pentru proba de ulei de somon din S0 ținută la

A) RT, B) 4°C

Aceste 2 spectre le vom folosi ca referințe pentru experimentul A în observarea diferențelor atât temporale cât și de temperatură.

În continuare vom prezenta spectrele obținute din fiecare săptămână pentru proba ținută la RT pentru a le compara cu spectrul din S0, făcând astfel analiza longitudinală (S0 comparat cu restul săptămânilor) și transversală (diferențele dintre proba la RT și cea la 4°C din fiecare săptămână) menționate în capitolul 4:

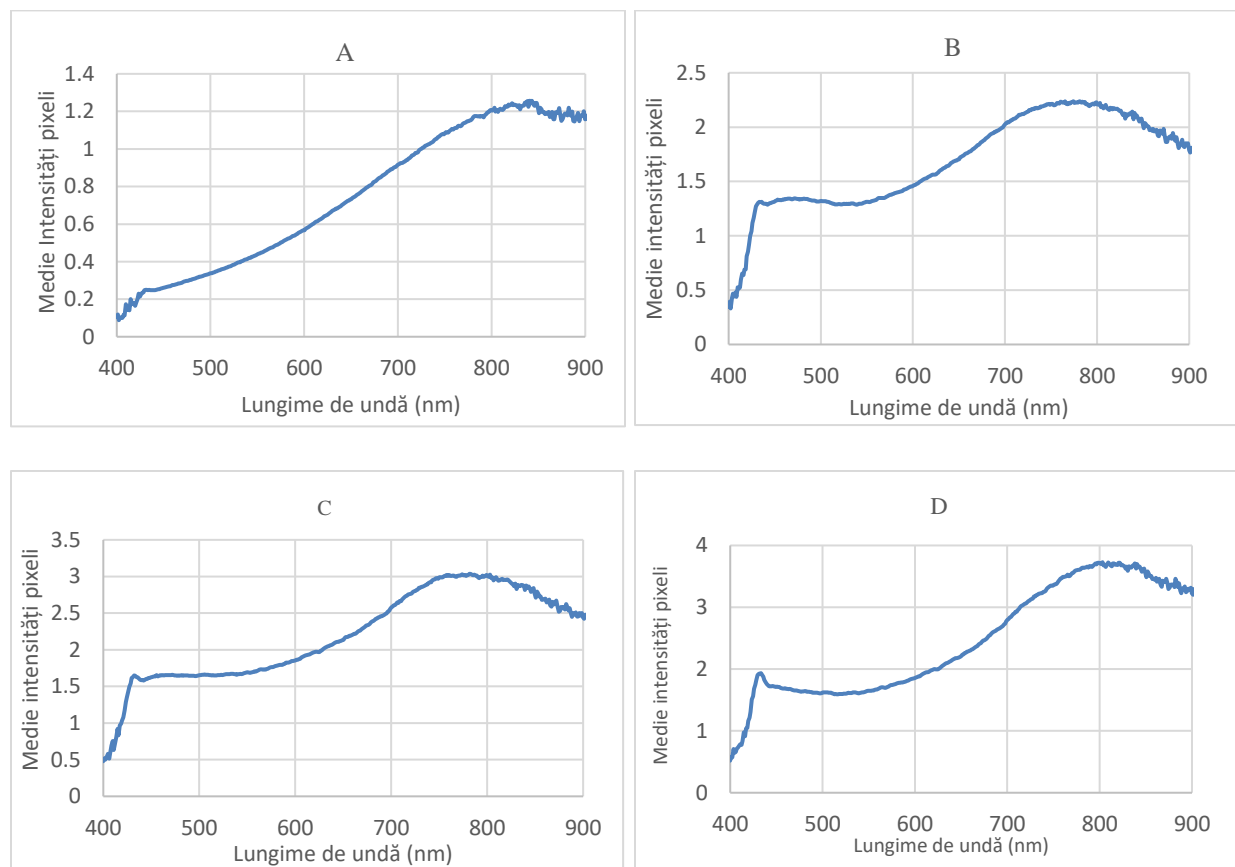


Figura 5.5. Spectrele medii pentru proba de ulei de somon ținută la RT

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

Analog, se face aceeași analiză longitudinală și pentru proba ținută la 4°C:

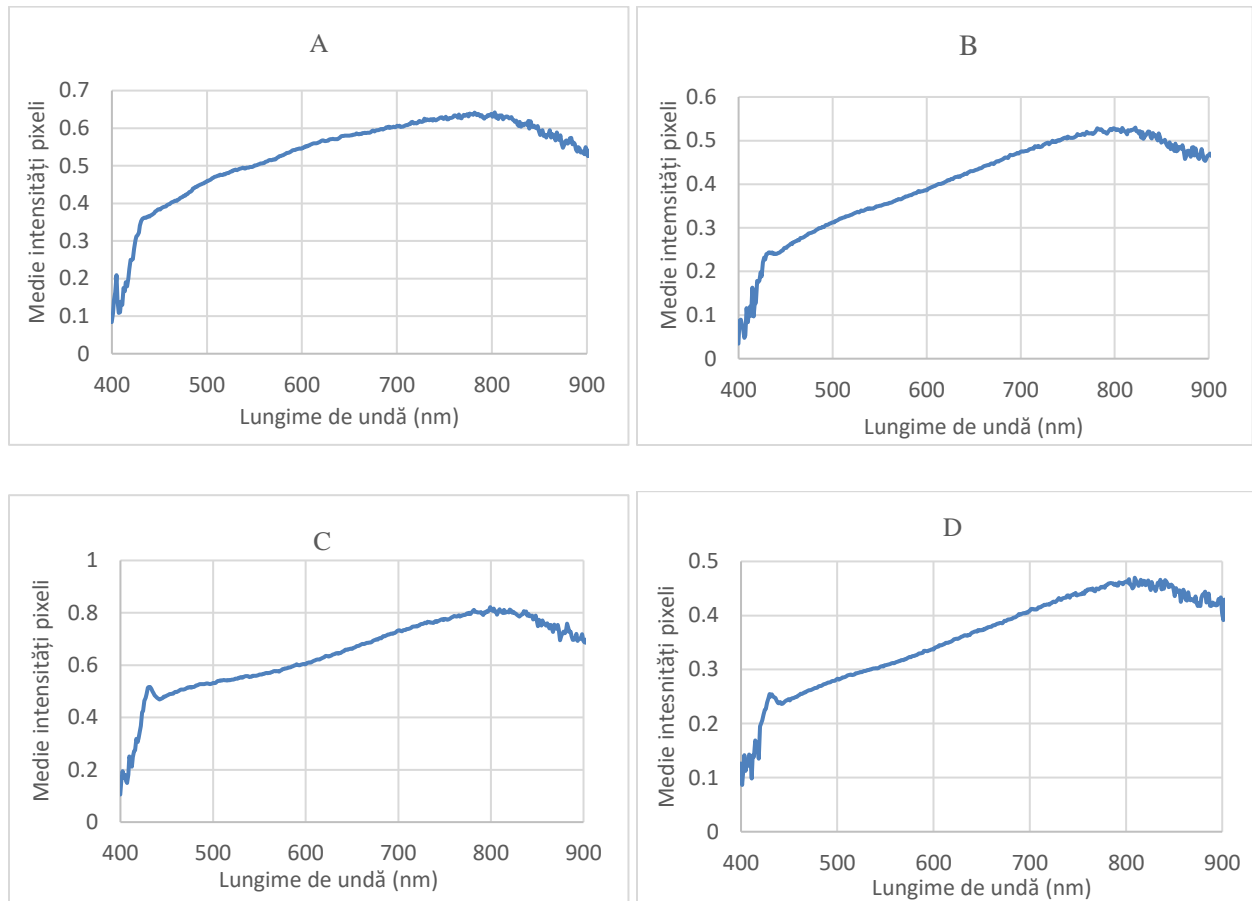


Figura 5.6. Spectrele medii pentru proba de ulei de somon ținută la 4°C

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

În continuare introducem câteva exemple de imagini în transmisie pentru analiza transversală și longitudinală a evoluției probei. Imaginile au fost achiziționate cu obiectivul de mărire 40x Plan-Fluo, NA 0.6, intensitatea luminoasă a sursei fiind setată la 67% din maxim.

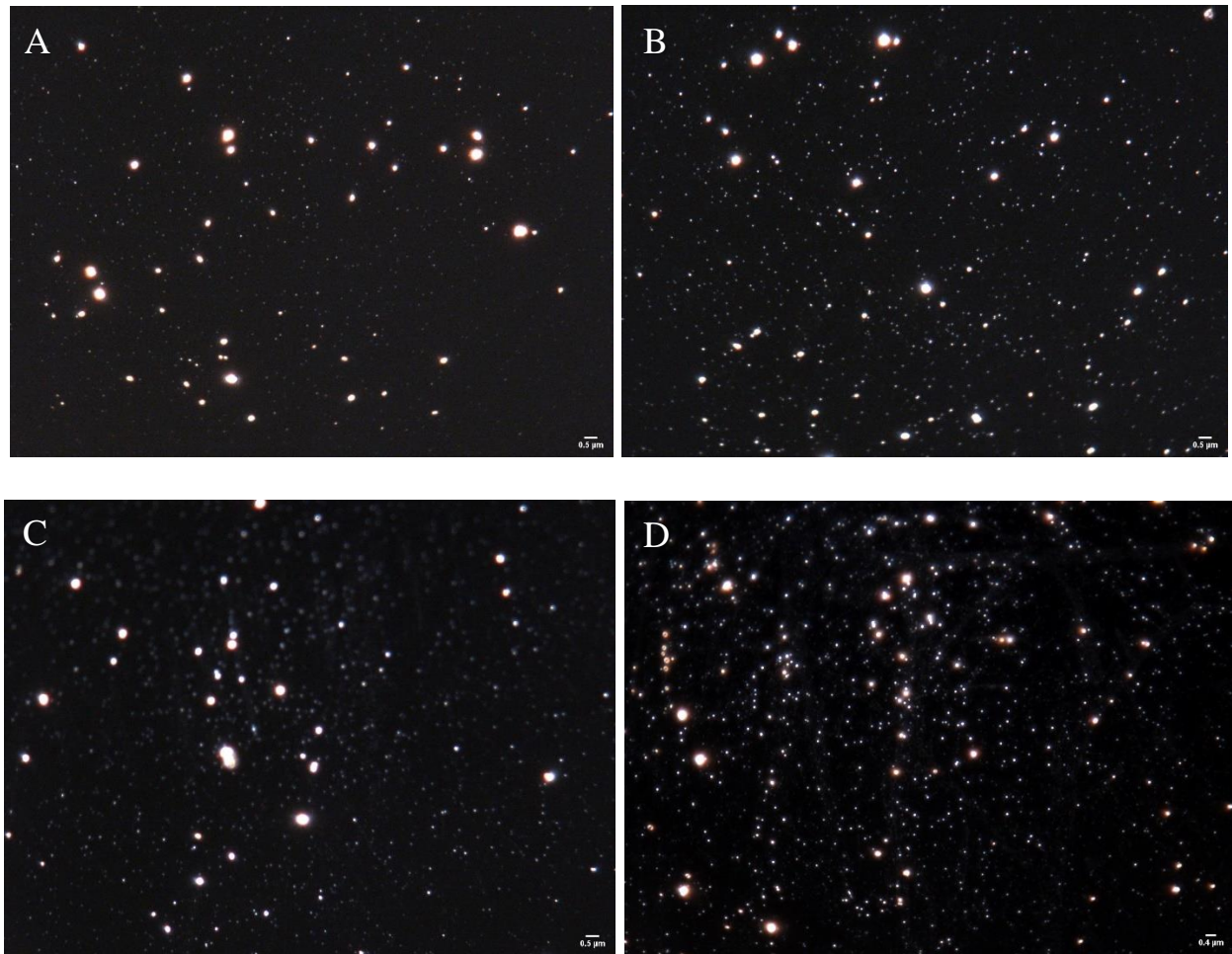


Figura 5.7. Imaginile optice de câmp întunecat pentru proba ținută la RT:

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

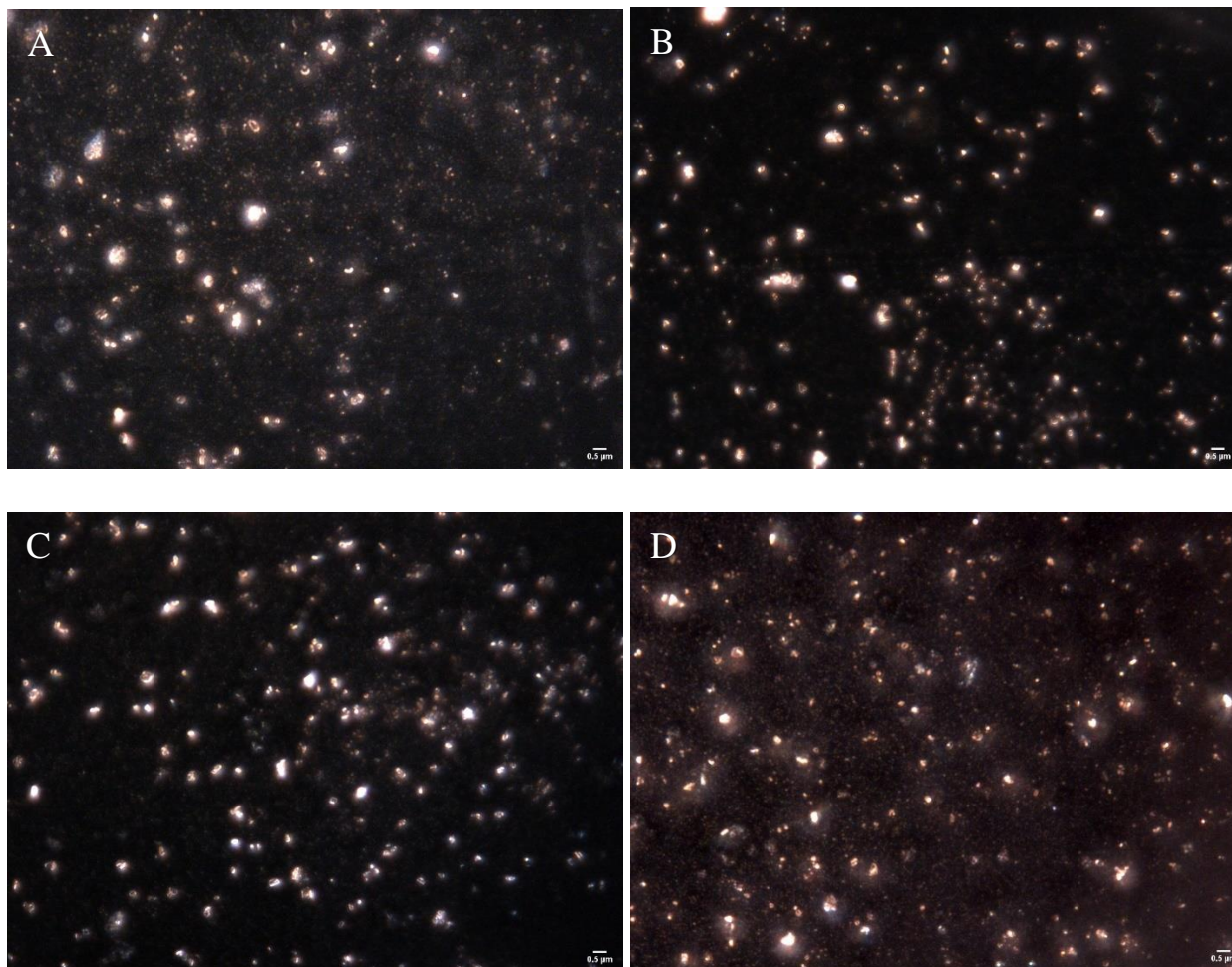


Figura 5.8. Imaginile optice de câmp întunecat pentru proba ținută la 4°C:

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

Observăm că între proba ținută la RT nu există diferențe semnifiante. Pentru proba la 4°C există diferențe atât temporale cât și de temperatură cu cea ținută la RT. Se observă o cristalizare a particulelor de ulei de somon pentru proba ținută la 4°C față de cea la RT care pastrează forma sferică a particulelor. Pe măsură ce înaintăm în timp proba cristalizează tot mai tare, deformând considerabil aspectul original al particulelor de ulei de somon.

5.2 Experimentul B

5.2.1 Utilizarea spectrofotometrului în studierea spectrului pentru experimentul B

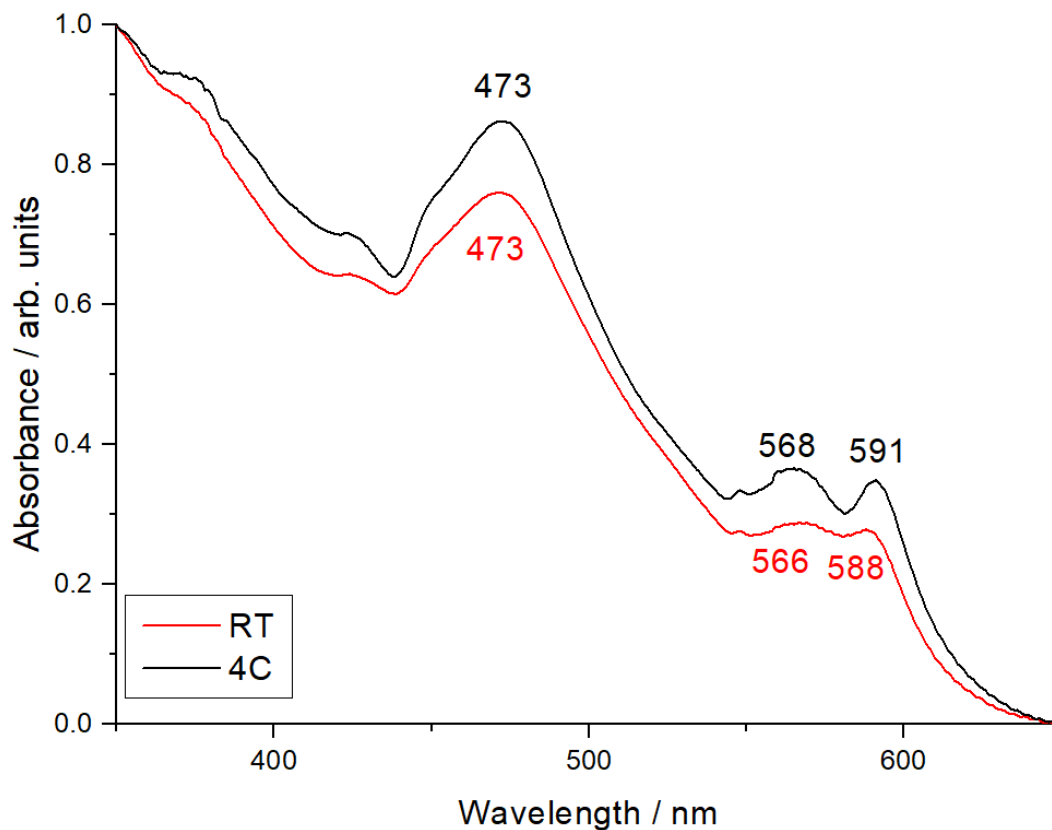


Figura 5.9. Spectrele probei experimentului B de ulei de somon normalizate pentru comparație (negru spectrul la 4°C cu peakurile semnificative, roșu spectrul la RT cu peakurile semnificative)

Din cele două spectre normalizate se observă că proba la RT are o absorbantă mai mică decât cea la 4°C, iar peak-urile de la 568 nm, respectiv 591 sunt mult mai pronunțate pentru proba la 4°C decât pentru cea la RT unde sunt mult mai aplatizate.

Tabelul 5.1. Calculul “shiftării” peakurilor probei ținută la RT comparative cu cea ținută la 4°C

	Peak 1	Peak 2	Peak 3
RT	473 nm	566 nm	588 nm
4°C	473 nm	568 nm	591 nm
Shiftare peakuri	0 nm	2 nm	3 nm

Prezentarea rezultatelor experimentului B se face întocmai ca și pentru experimentul 1. Vom începe prin a da un exemplu de imagine a probei din S0, precum și spectrul de referință calculat care îl vom folosi pentru compararea rezultatelor din celelalte săptămâni. Mai apoi vom începe analiza longitudinală cât și transversală atât din punct de vedere imagistic cât și spectral pentru fiecare săptămână în parte.

După cum am menționat și în capitolul 4, pentru acest experiment am depus câte o cantitate de ulei de somon în două tuburi Eppendorf, unul pe care l-am depozitat la RT și unul pe care l-am depozitat la 4°C. Din fiecare tub, în fiecare săptămână am depus pe lamelă o cantitate de 10 μL pe care am efectuat măsurători.



Figura 5.10. Proba lichidă la RT din S0, mărire obiectiv 40x, intensitate luminoasă 66%

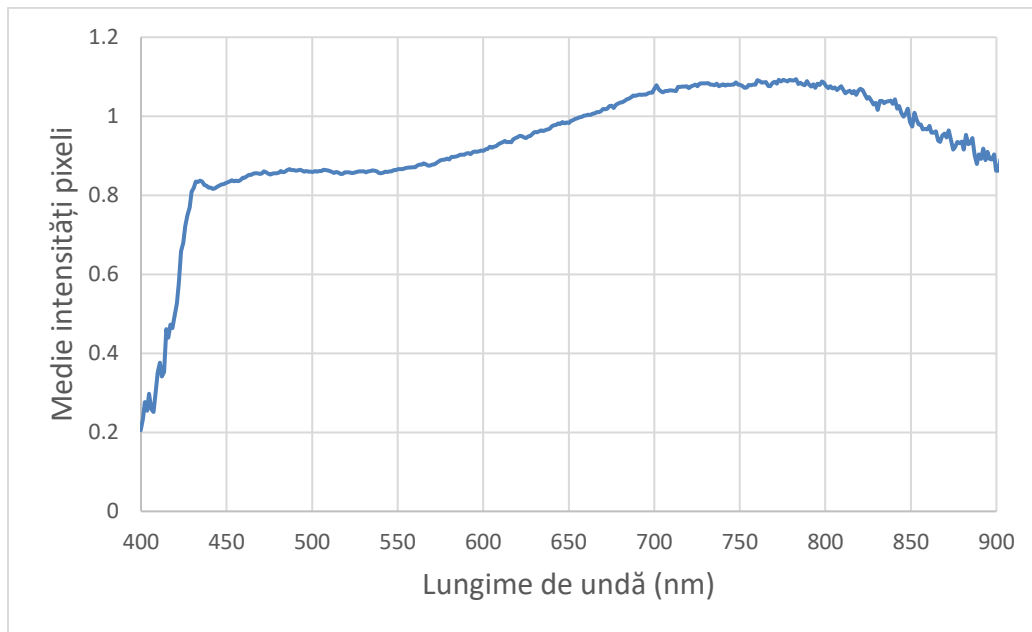


Figura 5.11. Spectrul mediu pentru proba de ulei de somon din S0 ținută la RT – Spectrul de referință pentru ambele probe

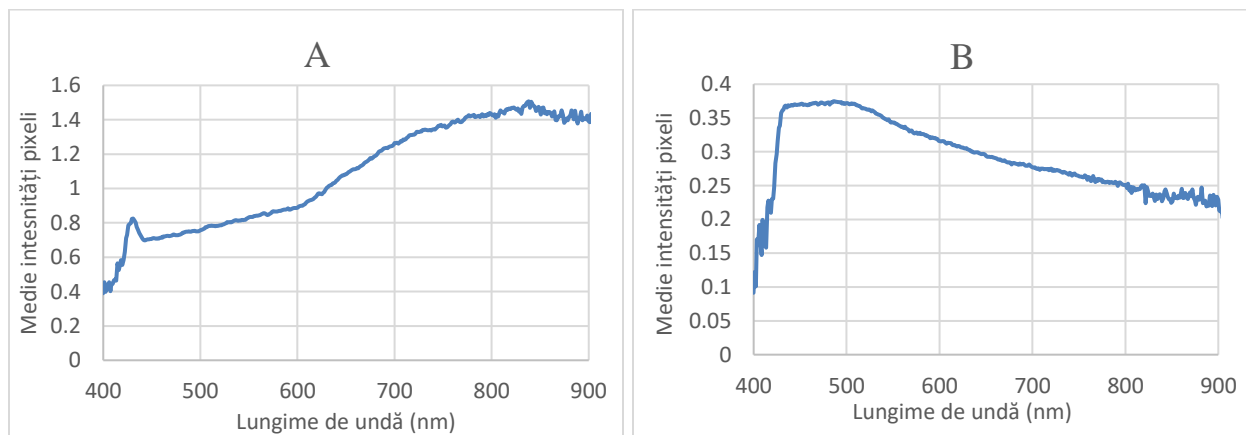


Figura 5.12. Spectrele medii pentru proba de ulei de somon ținută la RT:

A) S1, B, S3)

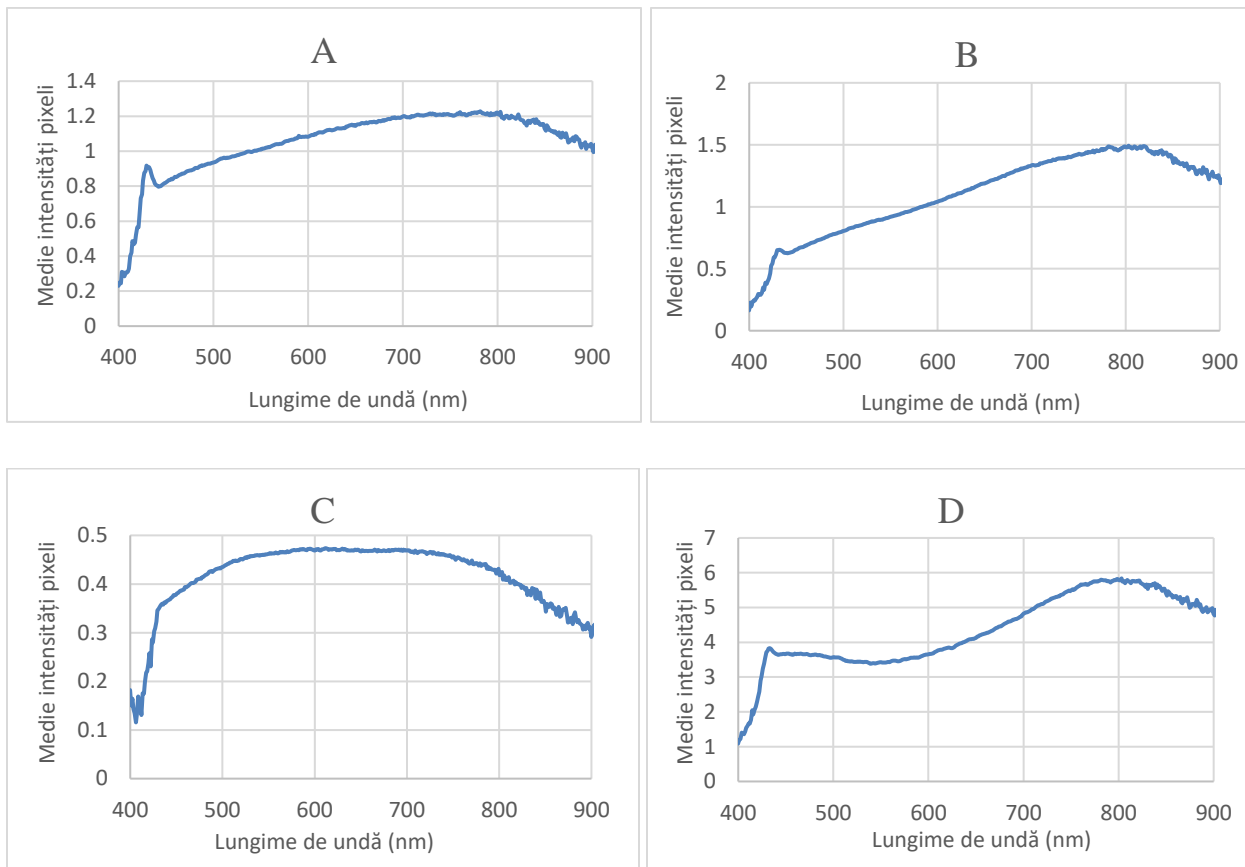


Figura 5.13. Spectrele medii pentru proba de ulei de somon ținută la 4°C

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

Pe parte imagistică, la fel ca și pentru experimentul A, introducem câteva exemple de imagini în transmisie pentru a observa evoluția longitudinală a probei.

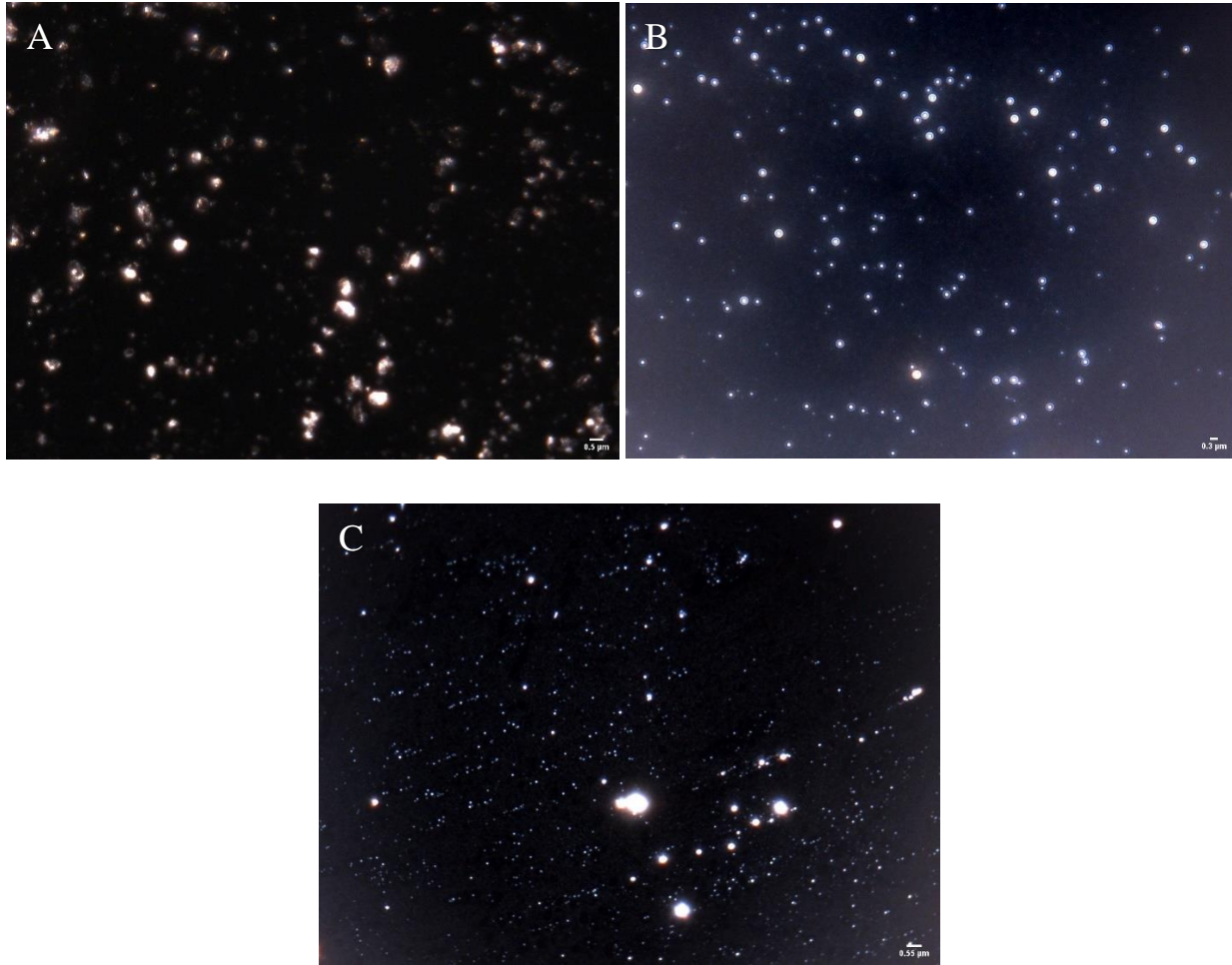


Figura 5.14. Imaginile optice de câmp întunecat pentru proba ținută la RT:

A). S1, B). S3, C) S4

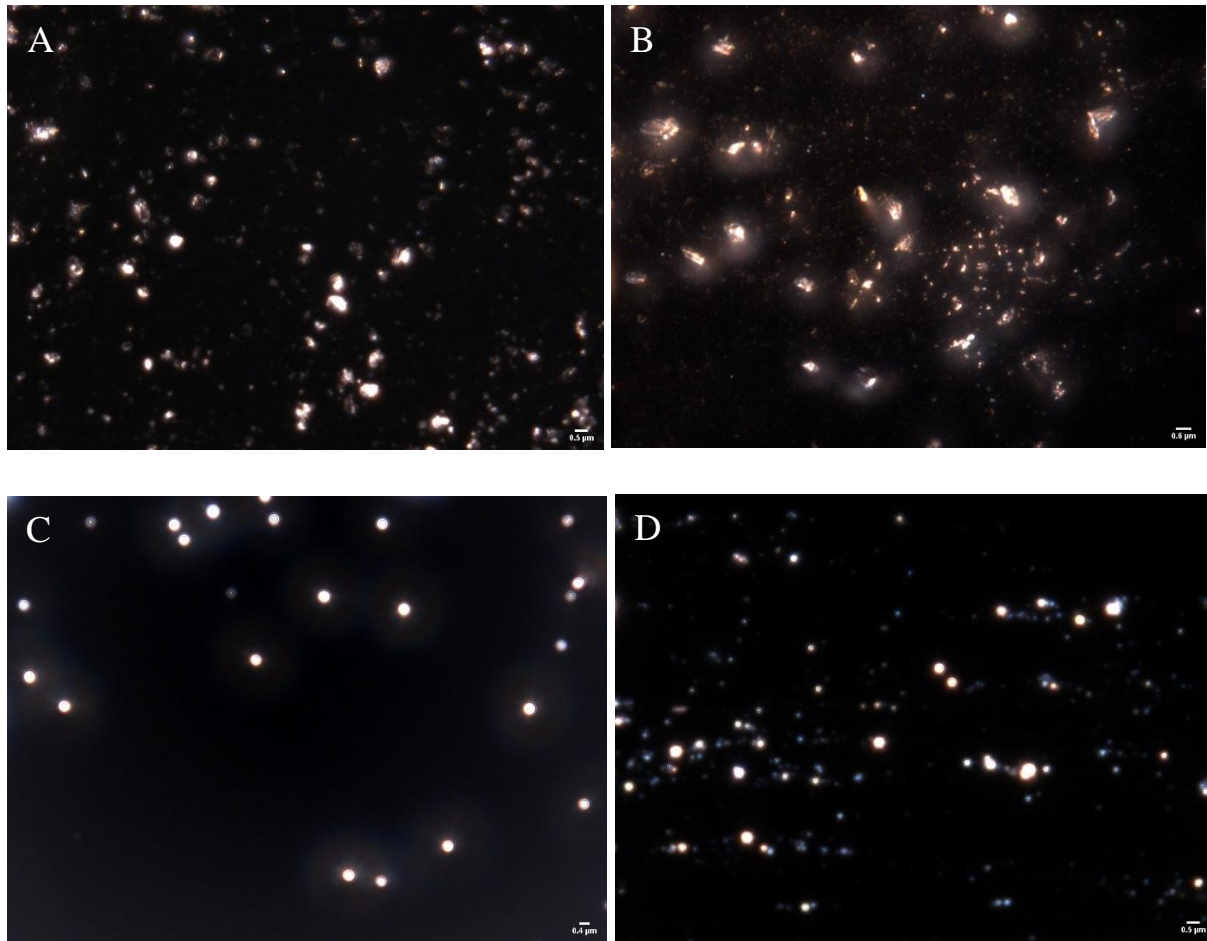


Figura 5.15. Imaginile optice de câmp întunecat pentru proba ținută la 4°C:

A) S1, B) S2, C) S3, D) S4

5.3 Analiză de date privind numărul de pixeli din fiecare ROI

Tabel 5.2. Calculul deviației standard față de media numărului de pixeli din fiecare săptămână

		Număr de pixeli din fiecare ROI				
		S0	S1	S2	S3	S4
Proba experiment A	RT1	237	583	468	182	370
	RT2	252	816	238	175	226
	RT3	218	752	304	277	225
	Medie \pm SD	235 \pm 13.91	717 \pm 98.29	336 \pm 96.69	211 \pm 46.52	273 \pm 68.12
	4C1	124	471	300	303	523
	4C2	265	369	408	266	325
	4C3	153	461	350	319	400
	Medie \pm SD	180 \pm 60.79	433 \pm 45.91	352 \pm 44.13	296 \pm 22.19	416 \pm 81.62
Proba experiment B	RT1	521	-	432	344	421
	RT2	183	-	627	232	219
	RT3	185	-	-	160	360
	Medie \pm SD	296 \pm 158.86	-	529 \pm 97.5	245 \pm 75.71	333 \pm 84.59
	4C1	521	260	359	336	336
	4C2	183	292	355	292	538
	4C3	185	304	337	353	419
	Medie \pm SD	296 \pm 158.86	285 \pm 18.57	350 \pm 9.56	327 \pm 25.7	431 \pm 82.9

Rezultatele obținute în urma analizei numărului de pixeli folosind funcția ROI ne indică faptul că deviația standard raportată la numărul de pixeli pentru experimentul A este mai mică decât pentru experimentul B, astfel cu ajutorul acestei analize putem efectua un control de calitate al diferitelor probe.

5.4 Procesarea de date folosind funcția “*Peak Location Classifier*”

Funcția “*Peak Location Classifier*” a softului ENVI 4.8 ne ajuta să găsim toți pixelii dintr-o imagine care au o lungime de undă de vârf specificată. De aceea o folosim pentru a căuta în imagini obiecte sau regiuni care au peak în spectru care se potrivește cu caracteristicile spectrale ale probei de analizat, în cazul nostru, uleiul de somon.[7]

În urma măsurătorilor la spectrofotometru pe proba din săptămâna 4 am observat că avem 3 peakuri caracteristice pentru uleiul de somon: la 473 nm, 566 nm și 588 nm pentru probă la RT, respectiv 473 nm, 568 nm și 591 nm la 4°C. Inițial s-a făcut o clasificare a pixelilor pentru proba de ulei de somon din săptămâna 4 pe fiecare imagine hiperspectrală, la fiecare lungime de undă la temperaturile specificate cu o toleranță de ± 10 nm. Rezultatele pentru peakurile la 566 nm, 588 nm respectiv 568 nm, 591 nm au fost satisfăcătoare deoarece prezentau cum se grupează pixelii la lungimile de undă respective, arătând o diferențiere. Totuși, pentru lungimea de undă de 473 nm rezultatele obținute au fost nesatisfăcătoare deoarece prezintă foarte mult zgomot, așa cum se exemplifică în figura 28.

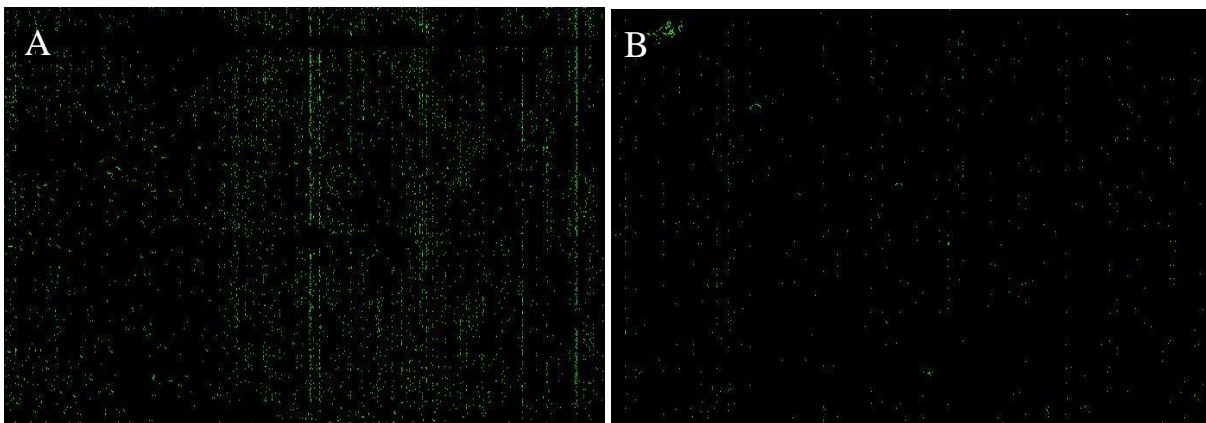


Figura 5.16. Exemplu al clasificării pixelilor la 473 nm

A) Proba la RT, B) Proba la 4°C

Așadar, ca măsură de a evita zgomotul în analiză, am efectuat clasificarea pixelilor la o lungime de undă de 580 nm cu toleranță de ± 20 nm.

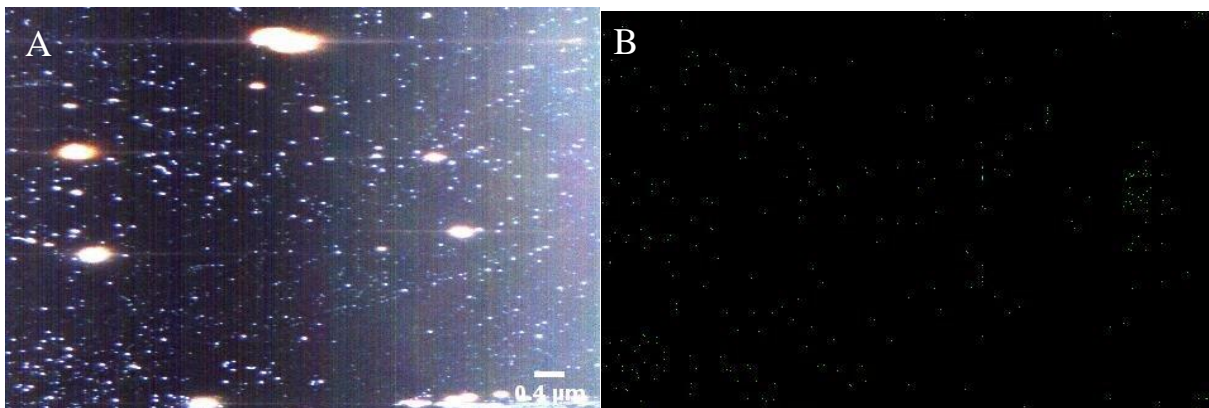


Figura 5.17. (A) Imaginea hiperspectrală RT1 a probei împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

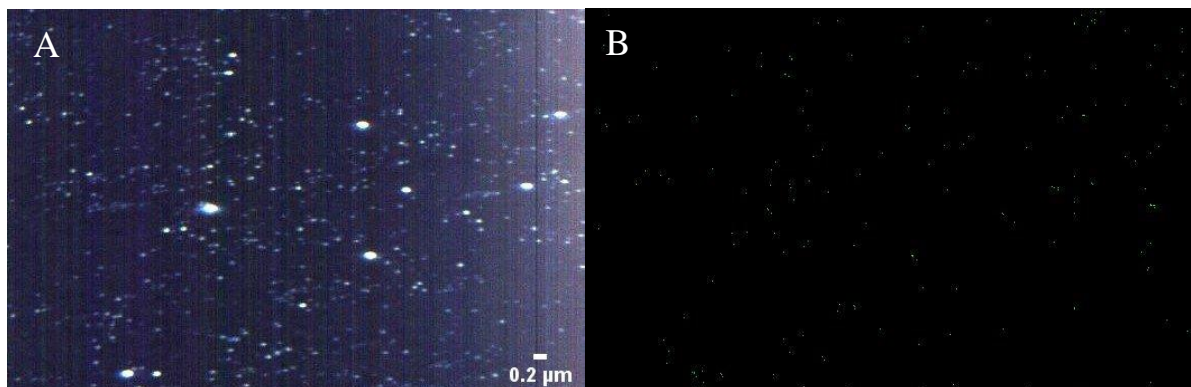


Figura 5.18. (A) Imaginea hiperspectrală RT2 a probei împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

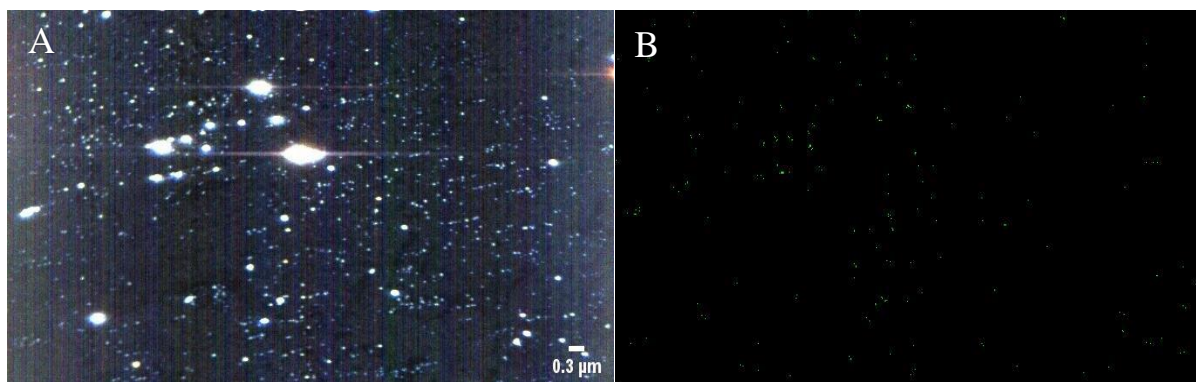


Figura 5.19. (A) Imaginea hiperspectrală RT3 a probei împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

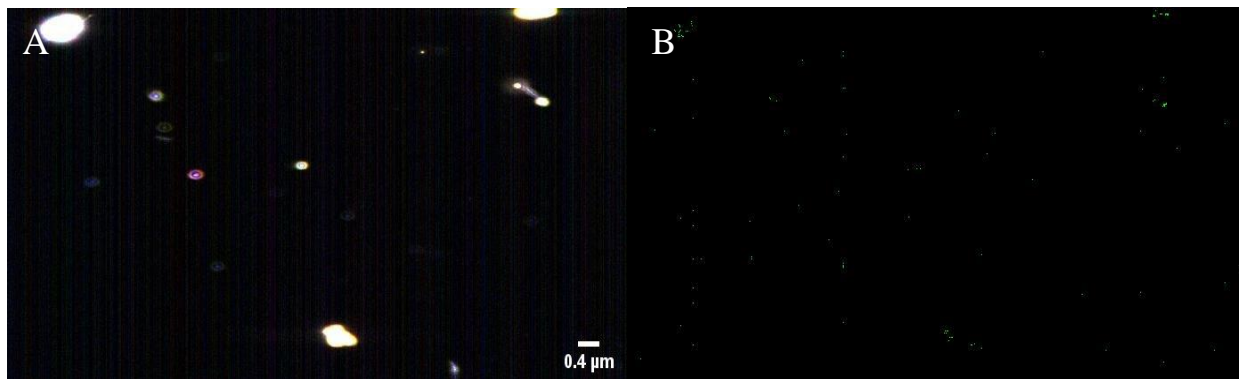


Figura 5.20. (A) Imaginea hiperspectrală 4C1 a probei la 4°C împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

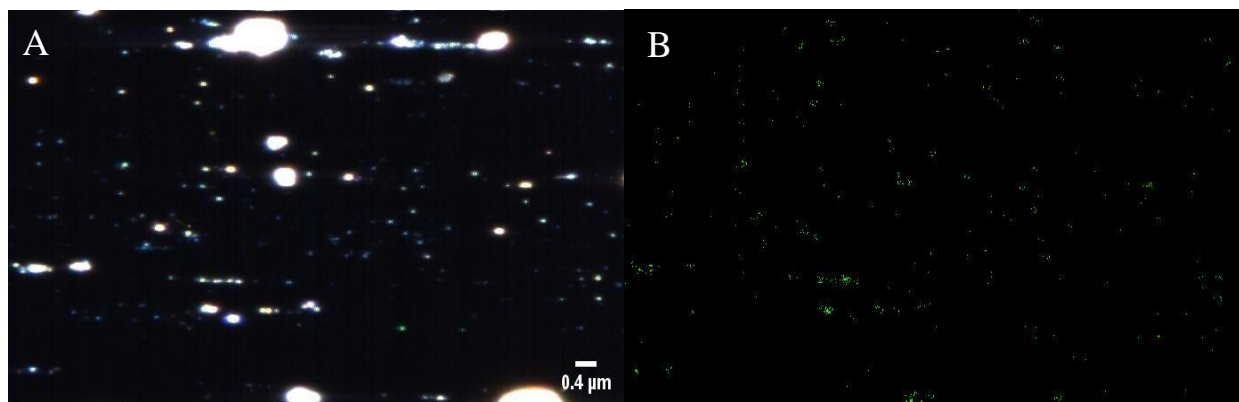


Figura 5.21. (A) Imaginea hiperspectrală 4C2 a probei la 4°C împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

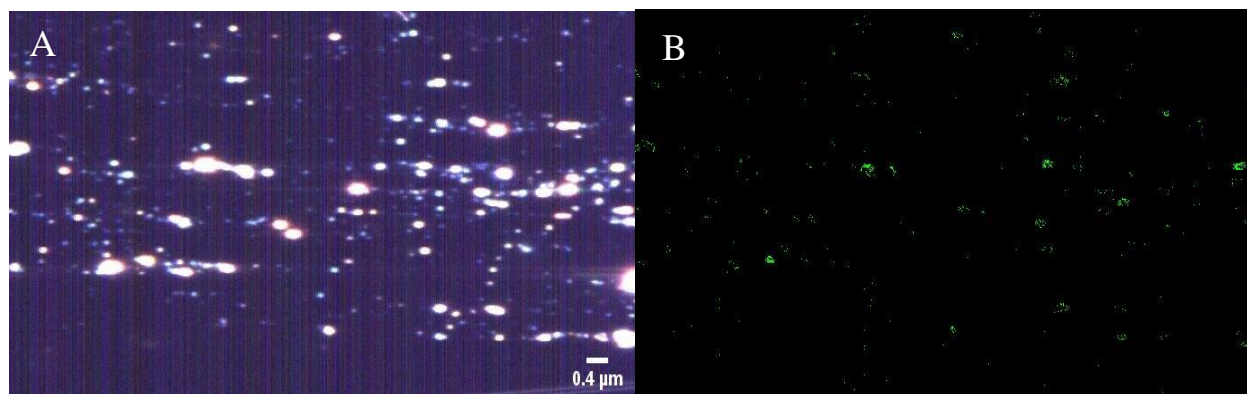


Figura 5.22. (A) Imaginea hiperspectrală 4C3 a probei la 4°C împreună cu (B) Localizarea pixelilor care prezintă peak maxim între 560-600 nm

Tabel 5.3. Procentajele pixelilor localizați la 580 nm cu toleranță de ± 20 nm

Proba S4 experiment B	Domeniu de localizare pixeli 560-600 nm
RT1	$8.7 * 10^{-4} \%$
RT2	$8.8 * 10^{-4} \%$
RT3	$8.9 * 10^{-4} \%$
Medie +/- SD	$(8.8 \pm 0.08) * 10^{-4} \%$
4C1	$4.7 * 10^{-4} \%$
4C2	$18 * 10^{-4} \%$
4C3	$25 * 10^{-4} \%$
Medie +/- SD	$(15.9 \pm 8.4) * 10^{-4} \%$

Rezultatele procentuale au fost obținute cu ajutorul softului ImageJ după cum s-a descries în capitolul 4. S-au folosit funcția ”*Histogram*” pentru determinarea numărului total de pixeli și a numărului de pixeli determinați cu funcția ”*Peak Location Classifier*” de pe fiecare imagine. S-a împărțit numărul de pixeli localizați la numărul total de pixeli de pe imagine și s-a obținut procentajul pixelilor caracterizați de domeniul spectral 560-600 nm.

A fost suficient să analizăm proba din S4 deoarece acesta este punctul de timp maxim unde se observă cel mai bine diferențele temporale și de temperatură între probe, astfel rezultatele din S4 sunt cele mai concludente pentru această etapă a măsurătorilor.

Din rezultatele obținute observate în tabelul 4 observăm că numărul de pixeli pentru proba la 4°C este aproximativ de două ori mai mare decât pentru proba la RT în domeniul spectral 560-600 nm. Acest lucru se corelează cu datele obținute în urma măsurătorilor la spectrofotometru unde se observă ca absorbanta probei la 4°C este mai mare decât cea a probei la RT. Așadar o absorbanta mai mare înseamnă un număr mai mare de pixeli activați pentru domeniul 560-600 nm, unde peakurile reprezentative pentru RT sunt 566 nm și 588 nm, iar pentru 4°C sunt 568 nm, 591 nm.

Concluzii

În urma efectuării acestui studiu s-a dorit evaluarea gradului de alterare a uleiului de somon în timp, la diferite condiții de temperatură, iar în acest sens s-au efectuat o serie de experimente pentru a obține rezultate în urma evoluției temporale a uleiului.

Imagistica hiperspectrală de câmp întunecat ne-a permis analiza în detaliu a caracteristicilor spectrale ale uleiului de somon de la săptămână la săptămână fără să fim nevoiți să utilizăm tehnici de preparare suplimentare pentru a manipula proba în obținerea rezultatelor dorite. Metoda microscopică în sine este specializată pe captarea informațiilor spațiale și spectrale din domeniul vizibil și infraroșu apropiat (400-1000 nm) pentru fiecare pixel al imaginii achiziționate, toate aceste informații rezultate în urma scanării hiperspectrale fiind înregistrate sub forma unui cub de date tridimensional.

Analiza s-a efectuat pe o proba 100% ulei de somon conform informațiilor de pe eticheta produsului, așadar caracteristicile spectrale ale acestuia au fost surprinse în cadrul acestui studiu și vor putea fi folosite ca și referință pentru identificare acestui compus în medii mult mai complexe, organice sau anorganice. Am găsit 3 peakuri de absorbție caracteristice pentru uleiul de somon, la 473 nm, 566 nm și 588 nm pentru RT, respectiv 473 nm, 568 nm și 591 nm la 4°C. S-a calculat procentajul pixelilor care s-au identificat în urma clasificării spectrale în domeniul 560-600 nm unde s-a observat diferențierea optimă a pixelilor cu un grad redus de zgomot. De asemenea s-a observat faptul că există schimbări în absorbția probei la 4°C, aceasta fiind mai crescută decât pentru proba la RT, lucru care se vede și în analiza "*Peak Location Classifier*", unde am obținut un număr aproximativ de două ori mai mare pentru proba la 4°C decât pentru proba la RT. Din punct de vedere optic, analiza temporală ne-a prezentat următorul lucru: în timp ce proba la RT nu prezintă schimbări semnificative, proba la 4°C cristalizează.

Așadar, în cadrul lucrării s-au pus în evidență noțiunile care stau la baza imagisticii hiperspectrale de câmp întunecat precum și performanța acestei tehnici de analiză spectrală care s-a observat prin timpul de achiziție scurt al imaginilor optice, precum și prin partea de software integrat pentru analiza de date de care dispune sistemul CytoViva. De asemenea, s-au putut

înregistra diferențe de calitate între probe în funcție de temperatură și de evoluția temporală care au fost evidențiate cu ajutorul softwareului de procesare al imaginii.

Uleiul de somon este un produs ce aduce multe contribuții benefice pentru starea de sănătate a organismului, iar caracterizarea lui cu ajutorul imagisticii hiperspectrale ne oferă un răspuns pe o cale inovativă despre modul în care diferențele de temperatură și evoluția temporală au un impact asupra proprietăților sale, aspecte subliniate prin rezultatele originale obținute ce constituie amprenta personală din toată multitudinea de studii efectuate pe acest produs.

La realizarea acestei lucrări se atribuie mulțumiri Mariei Lugojanu, Ștefaniei Iancu și Conf. Dr. Dana Maniu pentru ajutorul oferit în obținerea rezultatelor pe parcursul derulării experimentelor.

Bibliografie

1. Verebes, G.S.; Melchiorre, M.; Garcia-Leis, A.; Ferreri, C.; Marzetti, C.; Torreggiani, A. Hyperspectral enhanced dark field microscopy for imaging blood cells. *J. Biophotonics* 2013, 6, 960–967.
2. Xiao, L.; Yeung, E.S. Optical Imaging of individual plasmonic nanoparticles in biological samples. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2014, 7, 89–111.
3. Fairbairn, N.; Christofidou, A.; Kanaras, A.G.; Newman, T.A.; Muskens, O.L. Hyperspectral darkfield microscopy of single hollow gold nanoparticles for biomedical applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 4163–4168.
4. Hu, H.; Ma, C.; Liu, Z. Plasmonic dark field microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 2010, 96, 113107.
5. Gao, L.; Smith, R.T. Optical hyperspectral imaging in microscopy and spectroscopy—A review of data acquisition. *J. Biophotonics* 2015, 8, 441–456.
6. <https://www.cytoviva.com/cytoviva-enhanced-darkfield-microscopy> (accesat la 28.02.2022)
7. https://cytoviva.cn/wp-content/uploads/2021/pdf/CytoViva-User-Manual_10022020.pdf (accesat la 28.02.2022)
8. Gowen, A.A.; Feng, Y.; Gaston, E.; Valdramidis, V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta* 2015, 137, 43–54.
9. Zamora-Perez P., et al. Hyperspectral enhanced darkfield imaging of individual and collective hyperthermia-driven gold-copper sulfide nanoparticle, *Nanoscale* 2021, 13, 13256-13272.
10. <https://www.webmd.com/diet/salmon-oil-health-benefits> (accesat la 09.04.2022)
11. https://www.healthline.com/nutrition/salmon-oil-benefits#TOC_TITLE_HDR_2 (accesat la 09.04.2022)
12. <https://products.mercolamarket.com/salmon-oil/> (accesat la 09.04.2022)
13. Alahdal, Abdulrahman. Optimized Gas Chromatography-Mass Spectrometric Method to Profile Esterified Fatty Acids in Fish Roe and Fish Oil. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018. 80. 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000402.

14. Mari Merce Cascant, Cassandra Breil, Anne Silvie Fabiano-Tixier, Farid Chemat, Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia; Determination of fatty acids and lipid classes in salmon oil by near infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, Volume 239, 2018, 865-871.
15. Igarashi, T., Aursand, M., Hirata, Y. *et al.* Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in fish oils by high-resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Amer Oil Chem Soc* 2000, 77, 737-748
16. Melo Oliveira, Cidiane & Santos, Judes & Garcez, Ranieri; UV Spectrophotometry Applied to the Quantification of Omega-3, -6 and -9 in Fresh Tissues of Wild and Farmed Tambaqui. *International Journal for Innovation Education and Research* 2020, 8, 183-195.

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, **Gurghian Vlad-Alexandru**, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de **Fizică**, secția **Fizică Medicală**, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea **Iunie 2022**, sub îndrumarea **Conf. Dr. Zoltán Bálint**, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

22.06.2022

Nume,

Gurghian Vlad-Alexandru

Semnătură,

