



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT
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

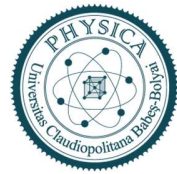
Brădean Luoana Lorena

2022



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT
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

ANALIZA HIPERSPECTRALĂ A AMPRENTEI MIERII DE ALBINE

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Brădean Luoana Lorena

2022

Cuprins

Introducere	4
Capitolul 1. Introducerea tehnicilor de analiză	5
1.1. Microscopia în câmp întunecat	5
1.2. Microscopia de fluorescență. Microscopia în contrast de fază	6
1.3. Imagistica hiperspectrală	8
Capitolul 2. Sistemul CytoViva	10
2.1. Componentele sistemului CytoViva	10
2.2. Iluminarea în câmp întunecat	11
2.3. Imaginile hiperspectrale	12
Capitolul 3. Mierea de salcâm	17
3.1. Proprietăți chimice și farmaceutice	17
3.2. Puritatea și calitatea	18
Capitolul 4. Materiale și metode	20
4.1. Procurarea probelor	20
4.2. Pregătirea probelor	20
4.3. Parametri de achiziționare a datelor	21
4.4. Procesarea datelor	21
Capitolul 5. Rezultate și comparații cu literatura de specialitate	28
5.1. Comparația imaginilor optice obținute	28
5.2. Analiza spectrală	34
5.3. Caracteristici particule	38
Concluzii	40
Bibliografie	41

Introducere

Prin integrarea tehnicilor de procesare a imaginilor și tehnicilor spectroscopice, imagistica hiperspectrală a devenit o tehnologie nouă care duce la obținerea informațiilor atât spațiale cât și spectrale de la o probă. Imagistica hiperspectrală s-a dezvoltat rapid în ultimii ani, într-una dintre cele mai puternice instrumente pentru analiza și controlul calității alimentelor. Astfel, imaginile obținute prin această tehnică, oferă un potențial de obținere a informațiilor mai precise și mai detaliate decât este posibil cu alte tipuri de tehnologii simple în industria alimentelor [1].

Această lucrare are ca scop analiza mierii de salcâm achiziționată de la diferiți producători. Pentru obținerea imaginilor am folosit diferite tehnici microscopice: microscopie de fluorescență, microscopie în contrast de fază și microscopie în câmp întunecat cuplat cu analiză hiperspectrală.

Capitolul 1 conține noțiuni introductive despre toate cele trei tehnici microscopice prezentate mai sus (microscopia de fluorescență, microscopia în contrast de fază și microscopia în câmp întunecat), cât și despre sistemul de analiză hiperspectrală cu care este echipat microscopul optic în câmp întunecat.

Capitolul 2 descrie în detaliu microscopul în câmp întunecat îmbunătățit cu imagistica hiperspectrală, prezintă componentele sistemului CytoViva și explică alegerea acestei tehnici pentru analiza mierii de albine, dar și modul în care au fost achiziționate imaginile hiperspectrale.

Capitolul 3 are ca scop prezentarea proprietăților fizice, chimie și farmaceutice ale mierii de albine de salcâm, argumentează motivul alegerii mierii de salcâm ca obiect al analizei și evidențiază trăsăturile ei caracteristice.

Capitolul 4 se axează pe descrierea procesului și metodelor de procurare a probelor, de pregătire și analiză a acestora. Sunt prezentați parametri de achiziție a imaginilor cât și analiza imaginilor și prelucrarea lor împreună cu compararea rezultatelor .

Capitolul 5 reprezintă o concluzie a lucrării pe baza comparării rezultatelor obținute cu cele raportate în literatura de specialitate.

Capitolul 1. Introducerea tehnicilor de analiză

1.1. Microscopia în câmp întunecat

Microscopia în câmp întunecat este un tip de tehnică microscopică utilizată în microscopia optică, unde doar o anumită parte a specimenului este iluminată de un fascicul de lumină, iar restul câmpului vizual este întunecat. Acest tip de microscopie funcționează ca o alternativă de contrast și de rezoluție mai mare față de microscopia cu contrast de fază, unde luminozitatea imaginii probei este modificată prin schimbări de fază [2].

Condensorul este responsabil pentru iluminarea în câmp întunecat, necesitând blocarea părții centrale a fasciculului de lumină care trece în mod obișnuit prin și în jurul specimenului. Acest lucru permite doar razelor oblice să interacționeze cu proba. Un condensor simplu conține o lentilă superioară sub formă sferic concavă, permițând formarea unui con inversat de lumină cu ajutorul razelor de lumină care ies de pe suprafața lentilei conul focalizând lumina pe partea centrală din planul probei. În locurile în care apertura numerică a condensorului este mai mare decât cea a obiectivului, sau în zonele care nu conțin proba, razele oblice se intersectează reciproc, trec pe lângă obiectiv, lăsând acele zone întunecate (Figura 1.1.). Razele oblice interacționează cu specimenul și sunt difractate, reflectate și/sau refractate de elemente din probă, atunci când o probă (în special una nealterată, care absoarbe lumina) este plasată pe o lamelă. Acest lucru permite razelor deviate să intre în obiectiv, rezultatul fiind un specimen luminos pe un fundal negru [3].

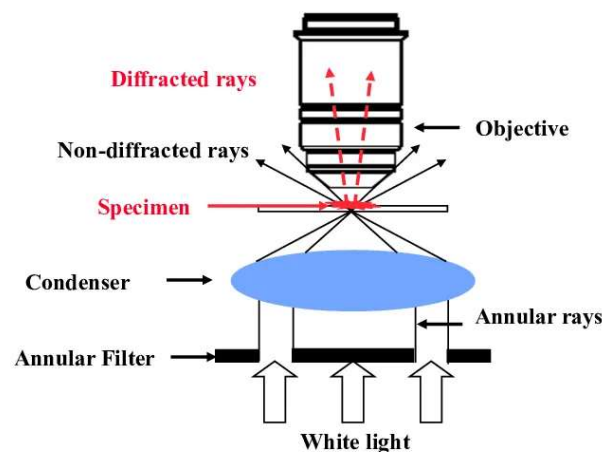


Figura 1.1 Principiul microscopiei în câmp întunecat [4].

Iluminarea în câmp întunecat este adecvată pentru observarea muchiilor conturilor, și limitelor probelor cu indice de refracție similar cu al aerului. Organismele acvatice vii, oasele, fibrele, părul, drojdia, insectele mici, bacteriile nealterate, celulele în cultură, țesuturile și

protozoarele reprezintă probe potrivite pentru iluminarea în câmp întunecat. Probele nebiologice includ cristale minerale și chimice, particule coloidale, secțiuni subțiri de polimeri și ceramică care conțin incluziuni mici, diferențe de porozitate sau gradientele ale indicelui de refracție.

Un pas important reprezintă pregătirea probelor pentru analiză cu microscopul în câmp întunecat, deoarece caracteristicile care se află deasupra și dedesubtul planului de focalizare pot împrăști lumina și pot contribui la degradarea imaginii. Astfel proba trebuie imobilizată și să fie suficient de subțire pentru a elimina efecte de tip „out-of-focus” blur. Un alt aspect ar fi curățarea lamei pe care este plasată proba sau acoperirea probei întrucât fiecare particulă de pe acestea va fi iluminată și poate produce confuzii în ceea ce privește interpretarea imaginilor rezultate în urma analizei microscopice.

Microscopia în câmp întunecat are o mulțime de aplicații utile în științele și industriile biologice și metalurgice. De exemplu identificarea părților celulare, localizarea și compoziția specimenului, motilitatea culturii. Acesta poate fi folosit pentru a observa celulele sanguine și părțile unei celule, secțiuni de țesut, diferite tipuri de nevertebrate, bacterii, alge, fân, pietre prețioase cum ar fi diamante și fracturi pe metale. Specimenele cu contrast scăzut și lichidele sunt probe potrivite pentru analiza cu această tehnică de microscopie. În plus, poate fi utilizată pe o varietate de alte aplicații, inclusiv în caracterizarea nanomaterialelor [3].

Avantajele acestui tip de microscopie sunt vaste. Prin fundalul său întunecat, probei i se oferă un grad ridicat de contrast, ceea ce face ca probele cu indicele de refracție similar mediului să fie ușor de vizualizat. Analiza probelor poate fi realizată fără ca speciunile să fie tratate, colorate sau marcate. Deoarece multe microscopie de laborator convenționale pot fi configurate pentru iluminarea în câmp întunecat, această tehnică este accesibilă [3].

1.2. Microscopia de fluorescență. Microscopia în contrast de fază

Pentru monitorizarea fiziologiei celulelor ca instrument de bază se folosește microscopia de fluorescență. Configurarea microscopului este realizată cu scopul de a crește contrastul și rezoluția spațială. Procesul pe care se bazează fluorescența implică absorbția de energie luminoasă (un foton) de către o probă, și emisia unei părți din această energie (ca un alt foton) după un timp de nivelul nanosecundelor. O anumită cantitate de energie este pierdută în acest proces, deci fotonul emis are energie mai mică decât cel absorbit. Lumina emisă de probă astfel are o valoare a lungimi de undă mai mare decât cea a luminii absorbite (excitație) [5]. Prin

excitarea atomilor sau moleculelor cu radiații de o energie mai mare, are loc absorbția, folosind de exemplu radiații din domeniul UV, iar emisia are loc de obicei în domeniul vizibil [6].

Un microscop cu fluorescență este un microscop optic care utilizează fluorescența în loc sau în plus față de reflexie și absorbție pentru a studia proprietățile substanțelor organice sau anorganice. Microscopul cu fluorescență a fost conceput în prima parte a secolului al XX-lea de August Köhler, Carl Reichert și Heinrich Lehmann, printre alții [7].

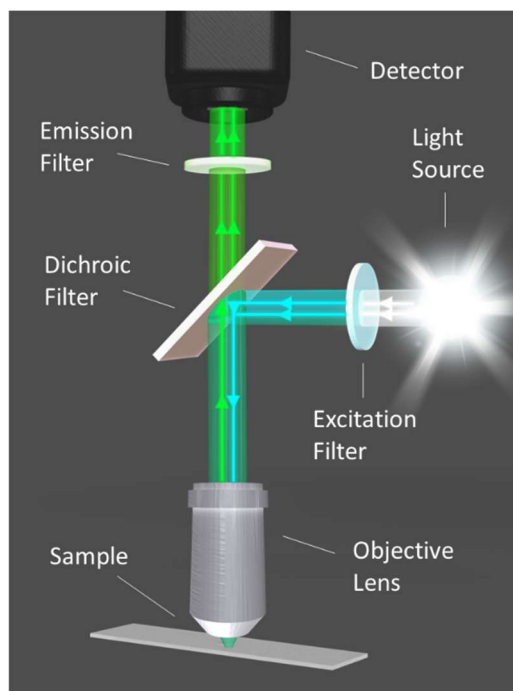


Figura 1.2. Diagramă care ilustrează filtrele optice și drumul luminii în microscopul de fluorescență cu iluminarea epi [8].

Microscopia în contrast de fază, a fost descrisă inițial de fizicianul olandez Frits Zernike, ca fiind o tehnică optică care îmbunătățește contrastul, care poate fi utilizată pentru a obține imagini cu contrast ridicat ale speciimenelor transparente, de exemplu celulele vii (de obicei în cultură), microorganismele, fragmentele de sticlă și particulele subcelulare (inclusiv nucleeele și alte organite), feliile subțiri de țesut, modelele litografice. Un mecanism optic interpretează variațiile schimbărilor de fază în modificări corespunzătoare ale amplitudinii, care pot fi vizualizate ca diferențe în contrastul imaginii [9].

Microscopul în contrast de fază prezintă două suporturi speciale pe care se plasează filtre care polarizează lumina. Lumina naturală a soarelui sau alte formă de iluminare artificială, transmite unde de lumină cu vectori de câmp electric care vibrează în toate planurile perpendiculare în

cea ce privește direcția de propagare. Vectorii câmpului electric pot fi limitați la un singur plan, prin filtrare, proces numit polarizare a luminii (toate undele vibrează în același plan) [10].

1.3. Imagistica hiperspectrală

Imagistica hiperspectrală (HSI) este un domeniu în plină dezvoltare, în care sunt combinate avantajele analitice ale spectroscopiei optice, cu vizualizarea obiectelor în două dimensiuni, obținută prin imagistică optică [11]. Această tehnică analizează un spectru larg de lumină în intervalul 400-1000 nm. Fiecare pixel al imaginii conține informații spectrale, care sunt adăugate ca o a treia dimensiune a valorilor la imaginea în 2D, generându-se un cub de date tridimensional, sau un hipercub.

Lumina care ajunge de la o zonă a probei este analizată în mai multe benzi spectrale diferite, pentru a oferi mai multe informații despre probă. În HSI, se poate detecta amprenta de absorbție unică a unui singur obiect. Alte tehnologii optice pot livra informații monocrome sau de absorbție policromă, însă HSI este capabil să distingă întregul spectru de culori în fiecare pixel, prin urmare, imaginea spațială în 2D este suplimentată de informații spectrale [12]. Imaginea de culoare RGB comună este un exemplu simplu și bine cunoscut de cub de date tridimensional, unde una din culorile: roșu, verde și albastru îi este atribuită fiecărui pixel. Cuburile de date hiperspectrale conțin informații despre absorbția, reflexia, sau spectrul de fluorescență pentru fiecare pixel de imagine [11].

HSI a fost introdusă pentru identificarea și cuantificarea constituenților chimici, dar și pentru determinarea amplasării sau distribuției spațiale a acestora în probă. Tehnologia HSI a fost aplicată recent ca un instrument analitic de proces pentru verificarea rapidă, nondistructivă și noninvazivă a produselor alimentare și agricole. Majoritatea metodelor hiperspectrale utilizează o abordare pe baza pixelilor, această metodă producând un număr mare de spectre predominant NIR („*near infrared*” – infraroșu apropiat) la nivelul probei, eliminând coerența spațială care este prezentă în analiză. Această tehnologie obține informații chimice în aceeași imagine și permite analiza de structuri, prin combinarea avantajelor analizei imaginii cu cele ale spectrometriei. Oferă de asemenea avantaje considerabile față de metodele convenționale, ducând imagistica hiperspectrală la un nivel superior față de alte metode. Permite obținerea de informații multicomponente dintr-o probă, și reușește să identifice distribuția spațială a mai multor componente chimice și fizice, fiind o metodologie analitică [13].

Pregătirea minimă a probei, timpii rapizi de achiziție și vizualizarea, respectiv analiza distribuției spațiale pentru numeroase compoziții chimice simultan, alături de natura

nedistructivă reprezintă principalele avantaje ale imagisticii hiperspectrale, față de metodele convenționale. Nevoia de metode rapide și fiabile de autentificare și identificare a obiectelor, au crescut interesul pentru punerea în aplicare a imagisticii hiperspectrale pentru controlul calității în agricultură, industrie farmaceutică și alimentară [1].

Această tehnică este potrivită pentru numeroase aplicații datorită multitudinii de informații și capabilității de a putea recunoaște caracteristici individuale ale probelor. Cu toate acestea, tehnologia are unele dezavantaje care trebuie luate în considerare înainte de folosirea acestei metode punerea în regimurile de evaluare a calității alimentelor.

Printre cele mai importante avantaje ale utilizării tehnologiei HSI în analiza alimentelor se numără următoarele aspecte:

- Nu este necesară pregătirea specială a probei.
- Nu se folosesc substanțe chimice pentru evaluare, ceea ce oferă siguranță și protecție mediului.
- Devine o metodă de analiză simplă și rapidă odată ce modelul de calibrare este construit și validat
- Este o metodă neinvazivă și nedistructivă, astfel încât aceeași probă ar putea fi utilizată și pentru alte analize
- Este o metodă economică, comparativ cu metodele tradiționale.
- Nu colectează un singur spectru într-un singur loc de pe o probă, ca în spectroscopie, ci înregistrează un volum spectral, ce conține un spectru complet din fiecare punct (pixeli) din probă.
- Oferă analiză completă după înregistrare. Se poate alege orice regiune de interes (ROI) din imagine și după achiziția imaginii. Atunci când un obiect sau un ROI în obiect prezintă caracteristici spectrale de interes, acea regiune poate fi selectată și spectrul său poate fi salvat într-o bibliotecă spectrală și analizat mai departe.
- Datorită rezoluției spectrale ridicate, oferă măsurători calitative cât și cantitative [1].

Capitolul 2. Sistemul CytoViva

Calitatea semnalului primit de detector după trecerea prin componentele microscopului conferă veridicitate datelor de microscopie HSI. Astfel, capacitățile de înaltă precizie a raportului semnal-zgomot ale iluminatorului EDF (*Enhanced darkfield*) devin esențiale pentru utilizarea eficientă a analizei HSI în probe biologice și în alte probe translucide. Pentru a utiliza iluminatorul EDF CytoViva a realizat un sistem microscopic hiperspectral complet integrat (Microscop hiperspectral CytoViva), care include o etapă translațională automată X/Y, un spectrograf cu grilaj de difracție cuplat cu detector și un software analitic personalizat, care permite cartografierea detaliată la nivelul pixelilor. Sunt disponibile opțiuni atât pentru infraroșu (VNIR) (400-1000 nm), cât și pentru infraroșu cu unde scurte (SWIR) (900-1700 nm). Combinația dintre capacitățile analitice și de cartografiere ale HSI și imagistica tehnicii de iluminare EDF oferă nanotehnologiei un puternic instrument de analiză. [14].

2.1. Componentele sistemului CytoViva



Figura 2.1 Componentele sistemului CytoViva din dotarea Facultății de Fizică din cadrul Universității „Babeș Bolyai”, Cluj Napoca

1. Computer cu două monitoare pentru achiziția, stocarea, vizualizarea și analiza imaginilor, care conțin software-urile ENVI 4.8 (pentru analiza hiperspectrală) și OCULAR (pentru vizualizarea imaginilor în câmp întunecat) – Figura 2.2.
2. Cablu optic ce ghidează lumina spre iluminatorul CytoViva.
3. Sursă de lumina cu lampă cu halogen, de putere 150W și domeniu de emisie de radiație între 400-2500 nm.
4. Camera optică.

5. Sistem microscopic Olympus în câmp întunecat.
6. Masă motorizată care se deplasează cu ajutorul unui joystick, pentru localizarea probei.



Figura 2.2 Screenshot cu Software-urile folosite pentru achiziționarea și analiza imaginilor

2.2. Iluminarea în câmp întunecat

Iluminatorul CytoViva în câmp întunecat permite observarea optică directă a probelor din medii transparente și translucide, fără a necesita etichetarea sau marcarea acestora. Performanța iluminatorului îmbunătățit reprezintă rezultatul unei căi luminoase ce reușește să concentreze densitatea maximă a fotonilor pe probă, permițând o performanță imagistică superioară a raportului semnal-zgomot [15].

Iluminarea în câmp întunecat a servit mult timp ca un instrument util în imagistica optică a probelor de natură biologică, deoarece folosindu-l, probele nu necesită marcarea. Apertură numerică mare, iluminarea unghiului oblic pentru producerea de imagini pe bază de reflexie, refracție și împrăștiere. Limitările iluminării standard a câmpului întunecat au apărut din două probleme. Prima problemă este reprezentată de dificultatea în focalizarea corectă a luminii emisă de condensor pe planul dorit al probei. A doua este reprezentată de pierderea luminii inerente prin diferite lentile de difuzie din componența microscopului, precum și prin spațiul dintre diafragma de câmp și intrarea în condensor. Tehnica de iluminare în câmp întunecat abordează aceste probleme printr-un sistem închis [15]. Sistemul închis direcționează iluminarea direct în condensor, fixând geometria căii de lumină de la sursa de lumină la fanta de intrare a condensorului (Figura 2.3). Aceasta concentrează densitatea maximă a fotonilor pe probă, permițând o performanță îmbunătățită a raportului semnal-zgomot. Astfel design-ul face ca focalizarea condensorului să se realizeze mai ușor și mai consistent pe planul de imagine dorit al probei [16].

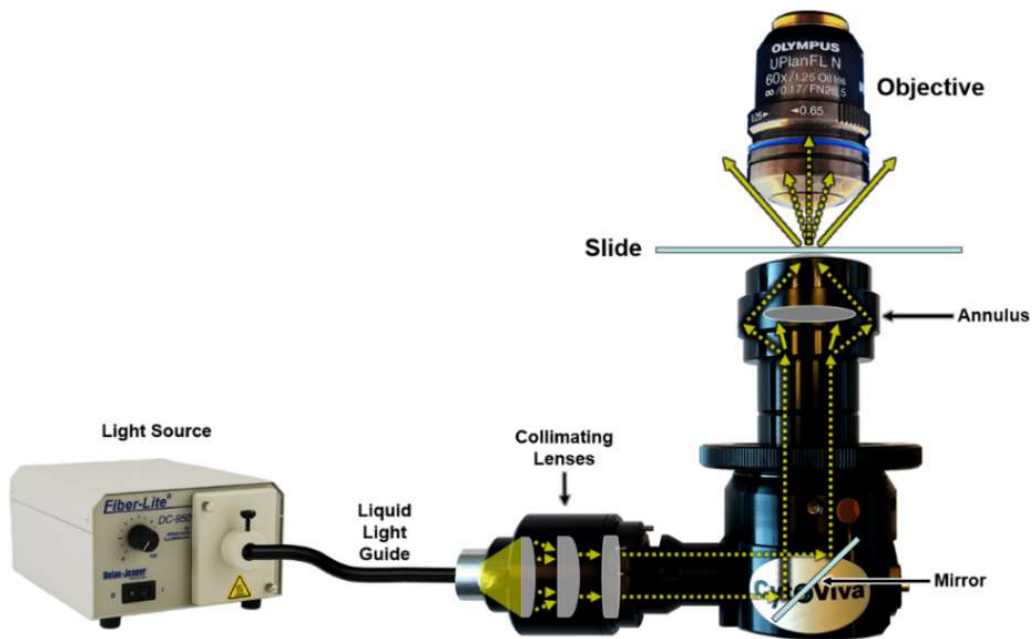


Figura 2.3 Reprezentarea drumului parcurs de radiația luminoasă prin iluminatorul CytoViva [15]

2.3. Imaginile hiperspectrale

Analiza suprafeței eșantionului se realizează prin translatarea lamei în incremente mici de-a lungul unei direcții cu platforma motorizată. Această mișcare aduce zonele adiacente ale eșantionului în poziția transversală, în care este înregistrată o imagine spectrală. Fiecare înregistrare acoperă o linie îngustă și conține spectrul fiecărui punct de-a lungul liniei. Prin repetarea acestei mișcări, se dobândesc spectrele dintr-o zonă bidimensională a eșantionului. Acest proces este cunoscut sub numele de scanare hiperspectrală “pushbroom”, și permite atât formarea imaginii eșantionului, cât și spectrul din fiecare punct al imaginii să fie capturate ca un cub de date hiperspectral. Dimensiunile cubului includ dimensiunile X și Y ale zonei spațiale și datele spectrale asociate fiecărui pixel al imaginii (Figura 2.4) [16].

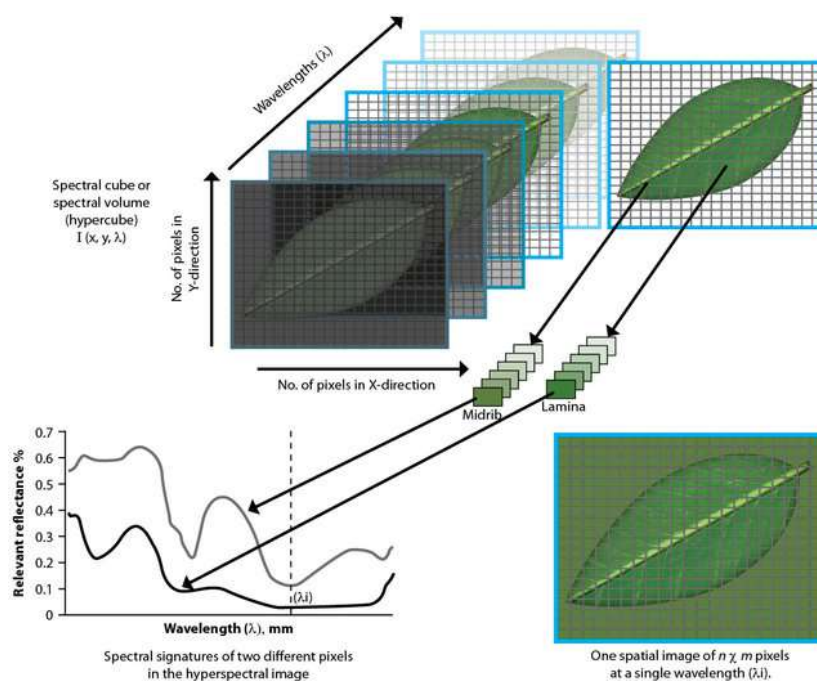


Figura 2.4 Ilustrație a unui cub hiperspectral creat prin combinarea a două direcții spațiale (X, Y) și una de lungimi de undă (λ), în imagistica hiperspectrală [17]

De obicei, aceste imagini hiperspectrale sunt create în câteva secunde, în funcție de expunerea aleasă și numărul de linii selectate. Componentele sistemului de imagistică hiperspectrală includ: o sursă de lumină specializată, o platformă translațională automată, un spectrograf de difracție a transmisiei și o cameră foto. Aceste componente sunt integrate pentru a lucra împreună cu software-ul de captare și analiză a imaginilor. Acest software oferă posibilitatea de a compara spectrele dintr-o imagine sau mai multe, de asemenea, poate construi o bibliotecă spectrală de elemente unice ale probei și folosind această bibliotecă spectrală, aceste elemente pot fi apoi mapate în probe ulterioare [18].

Achiziționarea unei imagini și caracteristici ale software-ului ENVI de bază vor fi prezentate pe rând. Primul pas este reprezentat de poziționarea lamelei cu proba pe platforma motorizată pentru analiză. S-a setat obiectivul dorit (în cazul nostru 40x) pentru analiză și s-au deschis cele două software-uri OCULAR (pentru captarea imaginii optice de câmp întunecat) respectiv ENVI 4.8 (pentru obținerea informațiilor hiperpsectrale). Prima parte a achiziției constă în obținerea unei imagini cu imagistică în câmp întunecat, zona de interes a probei fiind identificată cu ajutorul software-ului OCULAR. După realizarea acestui pas, se poate începe achiziția imaginii hiperspectrale.

- Se începe prin direcționarea luminii de la ocularul microscopului la camera hiperspectrală atașată microscopului. Se deschide programul ENVI 4.8 și se selectează deschiderea ferestrei de control a Microscopului hiperspectral CytoViva (Figura 2.6).



Figura 2.5 Print screen cu meniul programului ENVI 4.8 [19]

- După selectarea “CytoViva Hyperspectral Microscope” se va deschide fereastra de control în care se vor seta parametrii de achiziție: timp de expunere (0.25 secunde), obiectivul folosit (40x) cat și folderul în care se vor salva datele hiperspectrale, dar și numărul de linii dorite pentru scanare (Full-696) (Figura 2.6).

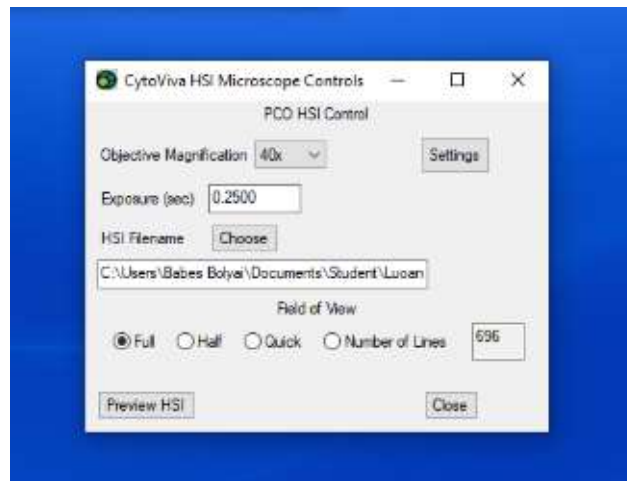


Figura 2.6 Print screen cu fereastra de control din care se setează parametrii de achiziție

- Se selectează Preview HSI pentru previzualizarea hiperspectrală (Figura 2.7) care va deschide o fereastră cu o histogramă a imaginii spectrale în timp real. Axa orizontală reprezintă axa X a imaginii HSI care va fi înregistrată, iar axa verticală reprezintă lungimea de undă a spectrului capturat în imaginea HSI. Imaginea din Figura 2.8 arată ca diferite obiecte luminoase se află în câmpul vizual, iar peste imaginea spectrală se suprapune un grafic al intensității. [19].

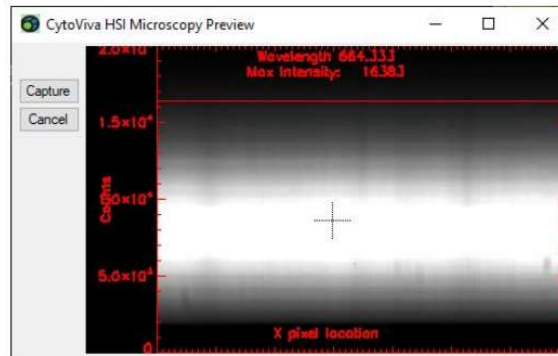


Figura 2.7 Fereastra de previzualizare a imaginii HSI cu axele histogramei, lungimea de undă și intensitatea maximă a pixelilor [19]

- Focalizarea pe imaginea hiperspectrală corespunde de obicei cu focalizarea din ocular, obiectele care apar focalizate printr-un ocular sunt focalizate și în camera HSI. Din cauza grosimii probei de multe ori este dificilă realizarea unei focalizări perfecte. Ca observatorul să verifice dacă imaginea pe care dorește să o achiziționeze este în focus, se verifică în fereastra de previzualizare a imaginii HSI dacă spectrul este unul ascuțit (Figura 2.8). Reglarea efectivă a lărgimii benzilor spectrale se realizează prin rotirea fină a microviziei. [19]

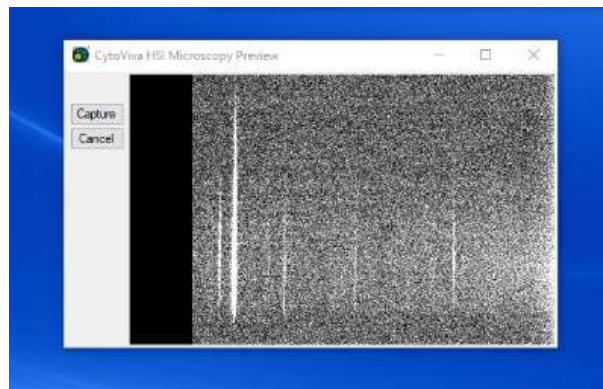


Figura 2.8 Print screen al ferestrei “Preview HSI” cu obiectele din probă în focus

- Prin selectarea butonului “Capture” scanarea începe, dar nu înainte de apariția pe ecran a două mesaje: primul de blocare a iluminării (se selectează butonul “OK” doar după direcționarea luminii către ocular), iar al doilea de deschidere a aperturii pentru capturarea imaginii (se apasă “OK” după redirecționarea luminii înapoi spre cameră) [19].

- Scanarea începe și pe ecran apare fereastra “Capture preview” (Figura 2.9) în care se poate observa construirea în timp real a cubului de date, linie cu linie și al graficului spectral de intensitate.

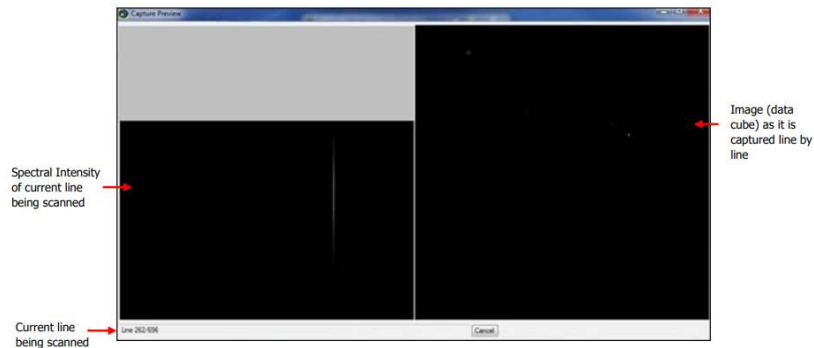


Figura 2.9 Fereastra “Capture Preview”, în partea dreaptă apare imaginea capturată linie cu linie, în timp ce în stânga apare intensitatea spectrală a liniei curente scanate. În stânga jos apare numărul de linii scanate din totalul de linii [19]

- În timpul scanării nu se modifică intensitatea sursei de lumină a sistemului și nu se mișcă suprafața pe care se află aparatul, pentru a nu apărea artefacte la achiziționare.
- La sfârșitul scanării se va deschide automat imaginea obținută în programul ENVI 4.8 (Figura 2.10)

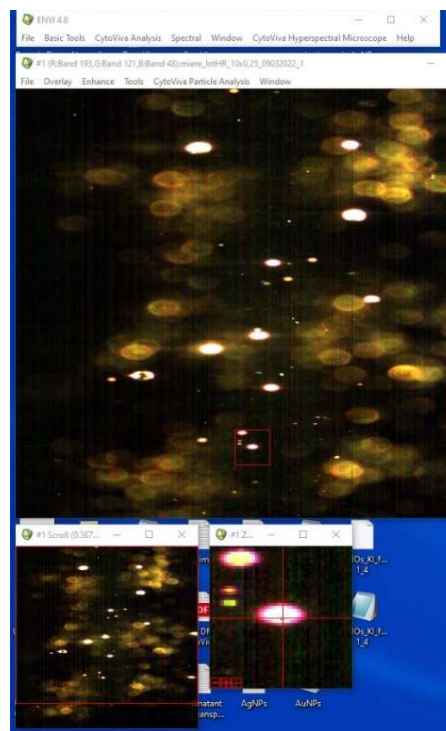


Figura 2.10 Print screen cu ferestrele care se deschid în programul ENVI 4.8 la sfârșitul scanării

Capitolul 3. Mierea de salcâm

3.1. Proprietăți chimice și farmaceutice

Mierea este considerată un potențial aliment complet, în ceea ce privește standardele nutriționale, fiind un produs natural, bogat în zaharuri simple, ușor asimilabile (fructoză, glucoză), enzime, aminoacizi și acizi organici, vitamine, uleiuri volatile, minerale și substanțe asemănătoare carotenoidelor [20]. România produce și exportă miere în Europa, cu o producție anuală de peste 20.000t în ultimii ani, din care jumătate este exportată. Mierea de salcâm, floarea-soarelui, teiul, rapița și mierea polifloră sunt printre cele mai frecvent produse tipuri de miere românească. [21].

Una dintre cele mai consumate alimente funcționale este mierea. Alimentele funcționale sunt acele alimente care sunt bine caracterizate prin numeroasele valori nutriționale pe lângă proprietățile lor naturale de promovare a sănătății și de prevenire a bolilor. Ca activități biologice ale mierii se numără proprietățile antioxidante, profilactice, imuno-modulatoare și curative ale cancerului. Dovezile experimentale indică faptul că mierea din diverse surse florale și geografice ar putea aduce mai multe efecte benefice pentru sănătate, care includ efecte gastroprotectoare, reproductive, hepatoprotectoare, antioxidante, antibacteriene, hipoglicemice, anti-fungice, antiinflamatorii și antihipertensive.[22].

Mierea conține apă (10-20%), zaharuri (70-85%) și mici cantități de alți compuși, incluzând proteinele (în special enzime), acizii organici, aminoacizii, vitamine, compușii fenolici și minerale. Monozaharidele (fructoza și glucoza) sunt reprezentate de un procentaj aproximativ egal cu 75-95% din zaharuri, dizaharide (zaharoză, nigeroză, izomaltoză, maltoză, turanoză, trehaloză) de un procentaj de 10-15%, trizaharide și zaharuri superioare (maltotrioză, rafinoză dextrină). Dizaharidele și trizaharidele sunt transformate de către albine din nectar în monozaharide, de exemplu zaharoza în glucoză, dar și fructoza, maltoza și maltotrioză tot în glucoză. Totodată, glucoza se poate transforma în acid gluconic și peroxid de hidrogen în prezența unei enzime pe nume glucozoxidază. Compoziția și proprietățile mierii ajung să fie puternic influențate de originea botanică și geografică, sezon, climă, timpul de recoltare, condiții pentru prelucrare și de depozitare. Mierea este adesea supusă falsificării datorită prețului ridicat și disponibilității limitate. Aceasta se poate obține în două moduri, fie direct, prin amestecarea cu diferite siropuri de zahăr ieftine (de trestie de zahăr sau sfeclă, orez, curmale, porumb, glucoză, agave, fructoză), fie indirect, prin hrănirea albinelor cu diverse zaharuri. Cererea de miere autentică, de înaltă calitate a crescut în uștimii ani. Astfel, în acest

context, găsirea celor mai eficiente metode de detectare a autenticității mierii este o problemă imperativă [21].

3.2. Puritatea și calitatea

Condițiile climatice alături de compoziția minerală a solului și metodele de răspândire a polenului influențează calitatea. Mierea de salcâm are o textură aproape transparentă, cu o aromă ușoară dulce, florală astfel fiind în topul celor mai populare soiuri de miere. Se poate folosi la gătit, datorită aromei sale dulci și pentru că se amestecă cu ușurință în lichide și aluaturi, dar și în băuturi. Mierea de salcâm poate rămâne într-o stare lichidă pentru o perioadă lungă de timp datorită concentrației sale ridicate de fructoză, iar datorită acestui fapt se cristalizează lent. Determinarea purității și calității mierii în scopuri de cercetare și scopuri comerciale a dus la identificarea unor variabile experimentale. Printre acestea se numără pH-ul, activitatea apei, conținutul de zahăr, conținutul de umiditate, conductivitatea electrică și contaminarea microbiană aciditatea liberă. Majoritatea indicilor menționați anterior au fost analizați și raportați în mierea de salcâm, conform articolului citat, toate acestea încadrându-se în limitele acceptate, ceea ce deschide calea pentru utilizarea frecventă a mierii de salcâm în cercetarea biologică și în aplicațiile comerciale [22].

Lucrul acesta se datorează faptului că substanțele produse de albinele ce produc miere, cum ar fi ceara, propolisul și veninul, s-au utilizat pentru proprietățile lor medicinale de-a lungul timpului. În plus, sunt biosintetizați antioxidanții și alți compuși bioactivi de un număr mare de plante, de la care albinele colectează nectar, astfel transferându-se o gamă largă de fitochimicale. Aceste fitochimicale prezintă importanță pentru consumatorii finali. Salcâmul este un tip de arbust și arbore care face parte din familia Fabaceae, ordinul Mimosoideae, astfel mierea de salcâm este produsă de albinele hrănite cu flori de salcâm, de unde și numele [22].

Pentru analiză hiperspectrală a mierii am ales acest tip de miere fiindcă este unifloră, conține un singur tip de grăuncioare de polen, și anume de salcâm. Dimensiunile grăuncioarelor de polen și forma lor regulată oferă o posibilitate de analiză și de comparație (Figura 3.1).



Figura 3.1 Exemplu de imagine optică a mierii de salcâm lot H1, obținută cu microscopul în câmp întunecat. Timp de expunere 100 ms, obiectiv 10x, apertură numerică 0.25.

Capitolul 4. Materiale și metode

4.1. Procurarea probelor

Probele folosite pentru realizarea acestei lucrări au fost cumpărate de la diferiți producători, produsele fiind pregătite corespunzător normelor prevăzute în comerț, fiecare fiind etichetată drept miere de salcâm. Cinci tipuri diferite de miere de salcâm au fost achiziționate în anul 2022 pentru a analiza cu ajutorul diferitelor tehnici microscopice menționate în lucrare, alături de sistemul hiperspectral. Probele de miere de la diferite surse au fost notate cu H1, H2, H3, H4, H5. Trei dintre tipurile de miere au fost achiziționate din supermarketuri, iar două dintre ele au fost achiziționate din magazine cu produse bio.

4.2. Pregătirea probelor

Pregătirea probelor s-a efectuat în aceeași manieră pentru toate cele 5 probe, s-au extras 10 μ L de miere și s-au plasat pe o lamelă de sticlă curată, cu dimensiunea de 76x26x1 mm. Cu un cover glass de 25 de mm s-a acoperit suprafața lamelei, acoperită la rândul ei cu miere și s-a presat pentru întinderea uniformă a mierii pe lamelă fără a contamina proba (Figura 4.1.). Slide-urile au fost montate în microscop și analizate imediat.

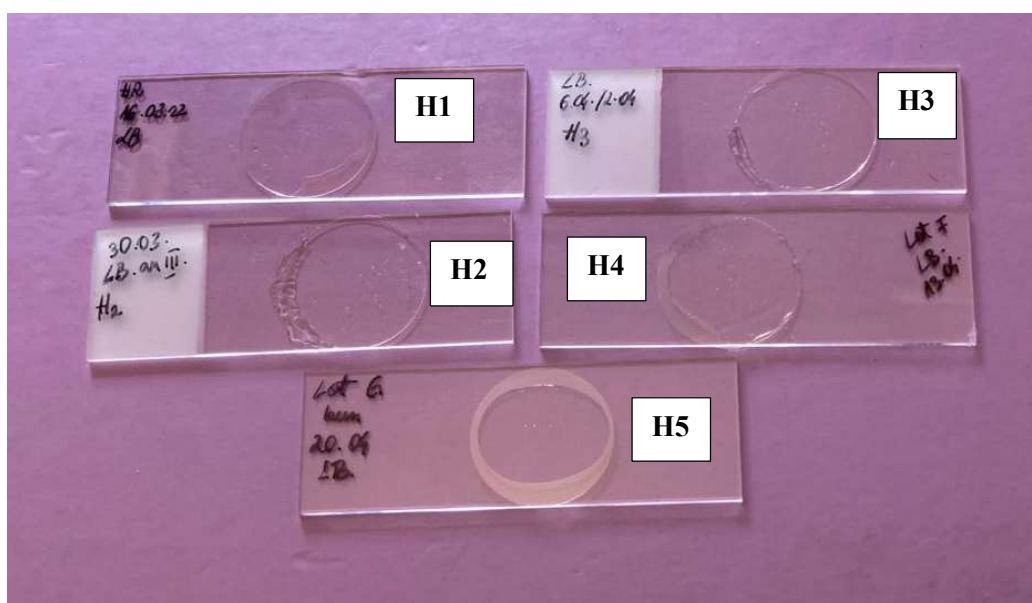


Figura 4.1 Exemple de lamelele cu cele cinci tipuri de miere de salcâm

4.3. Parametri de achiziționare a datelor

Pentru achiziționarea imaginilor optice s-a utilizat microscopul Olympus BX43 cu condensor EDFM integrat, folosind programul OCULAR și camera optică atașată microscopului. Obiectivul folosit pentru observarea tuturor probelor a fost cel de 40x/0.60, s-au depus pe suprafața condensorului câteva picături de ulei de imersie “Immersol” 518F. Timpul de expunere a fost setat la 0.1 secunde și treapta de 75% s-a folosit pentru reglarea intensității sursei de lumină.

Achiziția imaginilor în contrast de fază și în contrast de fază cu filtru polarizator s-a efectuat manual. Din cauza faptului că microscopul nu a avut atașată o cameră optică compatibilă pentru acesta, imaginile de la acest microscop s-au achiziționat cu o cameră foto de la un telefon. Obiectivul folosit pentru observarea probelor a fost cel Plan PH 20x/0.44.

Partea de achiziție a imaginilor în fluorescență a fost realizată tot cu microscopul Olympus BX43, însă pentru acest tip de imagini s-a folosit obiectivul Plan FLUO 40x/0.60, 2 filtre de excitație și un filtru de emisie CHROMA 69002 ET - DAPI/FITC/Texas Red [24]. Intensitatea sursei de lumină folosită pentru achiziționarea imaginilor cu filtre de excitație a fost maximă și timpul de expunere de 500 milisekunde, în timp ce pentru imaginile fără filtru s-a folosit treapta de 25% pentru reglarea intensității și timpul de expunere de o milisecundă.

În partea de achiziție hiperspectrală s-a utilizat sistemul de imagistică hiperspectrală CytoViva, respectiv programul ENVI 4.8, același obiectiv de 40x/0.60, cu timp de expunere de 0.25 secunde. Au fost achiziționate câte 696 de linii pe câmp vizual, astfel s-a scanat pe întreaga imagine. Acești parametri au fost păstrați pentru toate probele analizate.

S-au analizat între trei și cinci zone diferite din fiecare probă pentru o comparație ulterioară a datelor extrase din fiecare zonă de interes.

4.4. Procesarea datelor

Datele obținute în urma achiziționării imaginilor au fost prelucrate în programul ENVI 4.8. Pentru început, s-au normalizat toate imaginile la spectrul lămpii, deoarece datele din spectrul nenormalizat conțin pe lângă spectrul obiectelor de interes și spectrul lămpii, astfel spectrele ar fi fost înregistrate incorect. Pentru a realiza normalizarea s-au folosit datele ASCII ale spectretrului lămpii deja înregistrate în calculator.

După ce a fost realizat acest pas, s-a trecut la crearea de regiuni ROI (“region of interest”). Crearea acestor regiuni a presupus selectarea unui număr de pixeli, desenând pe ecran cu ajutorul mouse-ului zona de interes de pe imagine, în cazul nostru, zona din interiorul

particulelor de polen (Fig.4.2). Inițial s-a avut în vedere crearea a câte cinci ROI pentru fiecare imagine a fiecărei probe (25 ROI/probă), însă datorita unor artefacte apărute în imaginile hiperspectrale, au fost create mai puține ROI pentru unele probe. În final am obținut datele din tabelul 4.1.

Crearea acestor regiuni de interes a avut ca obiectiv extragerea unor spectre medii, specifice particulelor selectate din fiecare imagine, respectiv probă. Spectrele medii s-au creat în urma unirii tuturor regiunilor de interes dintr-o imagine și extragerii informației sub formă de ASCII. Cu ajutorul programului Matlab s-au creat spectre pentru probele H1-H5.

Tabel 4.1 Numărul imaginilor și ROI analizate în cadrul studiului

Nume probă	Număr imagini analizate	Număr ROI/imagine	Număr ROI/probă
H1	5	5	25
H2	5	5	25
H3	4	5	20
H4	3	5	15
H5	5	5	25

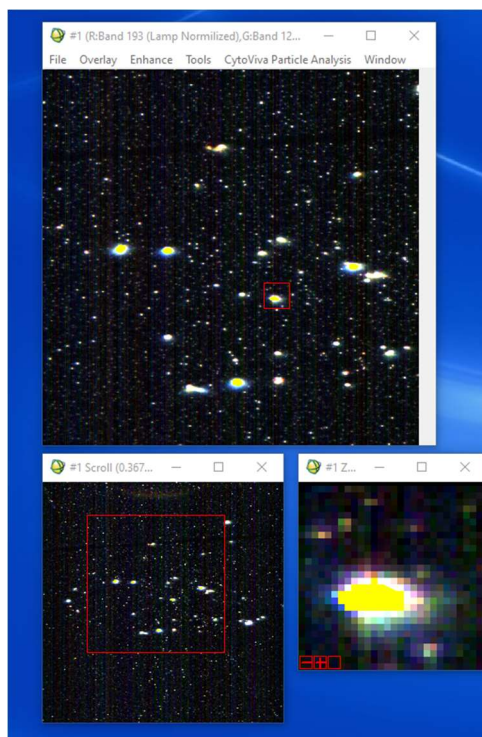


Figura 4.2 Print screen cu ROI selectați din imaginea analizată în programul ENVI 4.8

Pe baza informației obținute din spectre, cu ajutorul programului ENVI 4.8 s-a putut realiza o filtrare a imaginilor, filtrarea fiind efectuată la nivelul pixelilor. Din fereastra principală s-a accesat “CytoViva Analysis”, iar mai apoi funcția de interes, adică “Peak location classifier” (PLC). Această opțiune a identificat toți pixelii dintr-o imagine care au o lungime de undă specificată și poate fi folosită pentru a căuta în imagine regiuni sau obiecte cu un maxim în spectru, care se potrivesc caracteristicilor spectrale deja cunoscute [18]. În urma selectării PLC s-a deschis o fereastră de setare a parametrilor, în care s-au introdus: lungimea de undă a maximului spectral de interes; un interval care identifică și pixelii din jurul lungimii de undă introdusă anterior; zgomotul de fond, o valoare care trebuie introdusă în funcție de amplitudinea maximelor spectrale așteptate; nivelul de netezire pentru obținere de rezultate cât mai exacte, iar în final s-a putut alege dacă valoarea introdusă la început să reprezinte maximul spectral sau nu (Fig.4.3) [18].

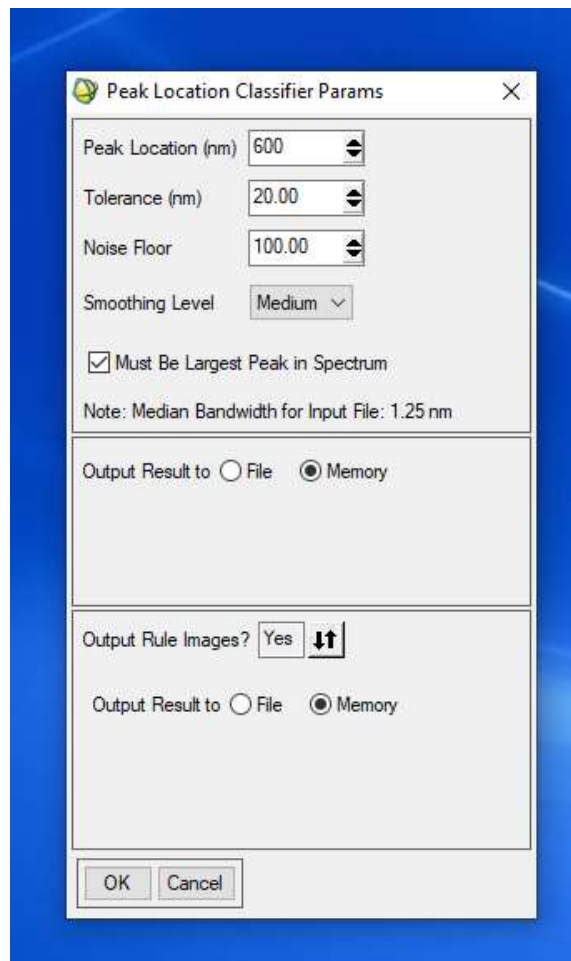


Figura 4.3 Print screen cu fereastra de introducere a valorilor al funcției PLC

După ce s-au introdus toate datele s-a obținut o imagine cu pixeli verzi pe un fundal negru, acei pixeli verzi fiind pixelii de intensitate dorită pentru analiza imaginilor (Fig. 4.4). S-a efectuat acest proces pentru imagini din fiecare probă.

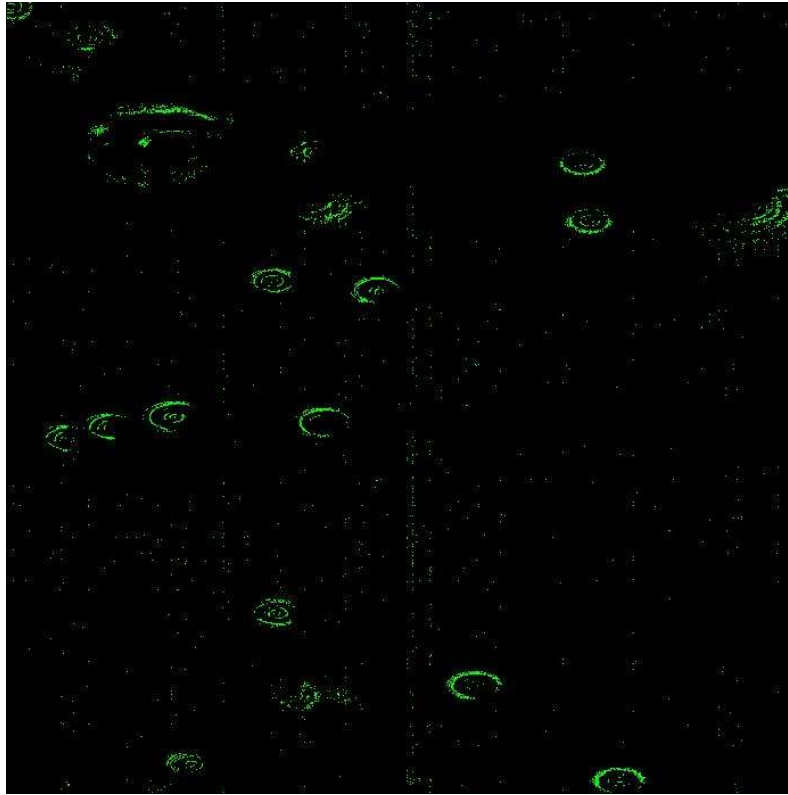


Figura 4.4. Imaginea probei H2 în urma aplicării funcției PLC

Scalarea imaginilor a fost realizată în programul ImageJ pentru toate imaginile. Odată cu achiziția de imagini a probelor de interes s-au achiziționat imagini și cu o lamela cu diviziuni cu obiectivul de 20x, respectiv 40x (Fig.4.5).

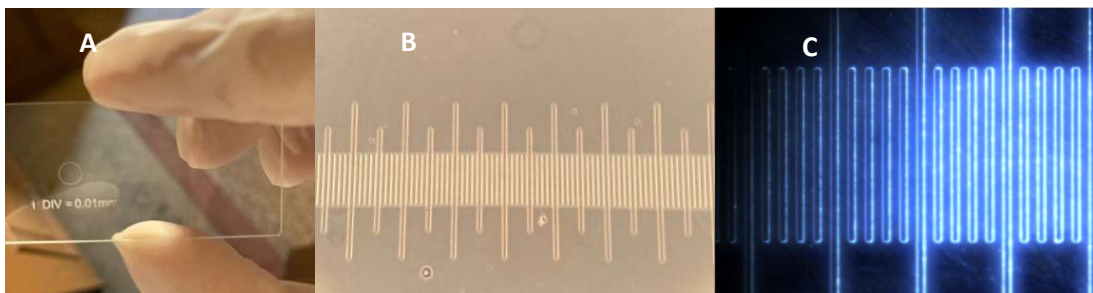


Figura 4.5 (A) Lamela inscripționată cu diviziunile (o diviziune=0.01 mm), (B) cu obiectivul de 20x, respectiv (C) cu obiectivul de 40x.

Imaginea care conține lamela cu diviziuni a fost deschisă în programul ImageJ și pentru obiectivul de 20x și pentru cel de 40x. Pe imagine s-a trasat o linie dreaptă între două diviziuni, s-a deschis meniul “Analyze”-“Set scale” Fig. 4.6A.

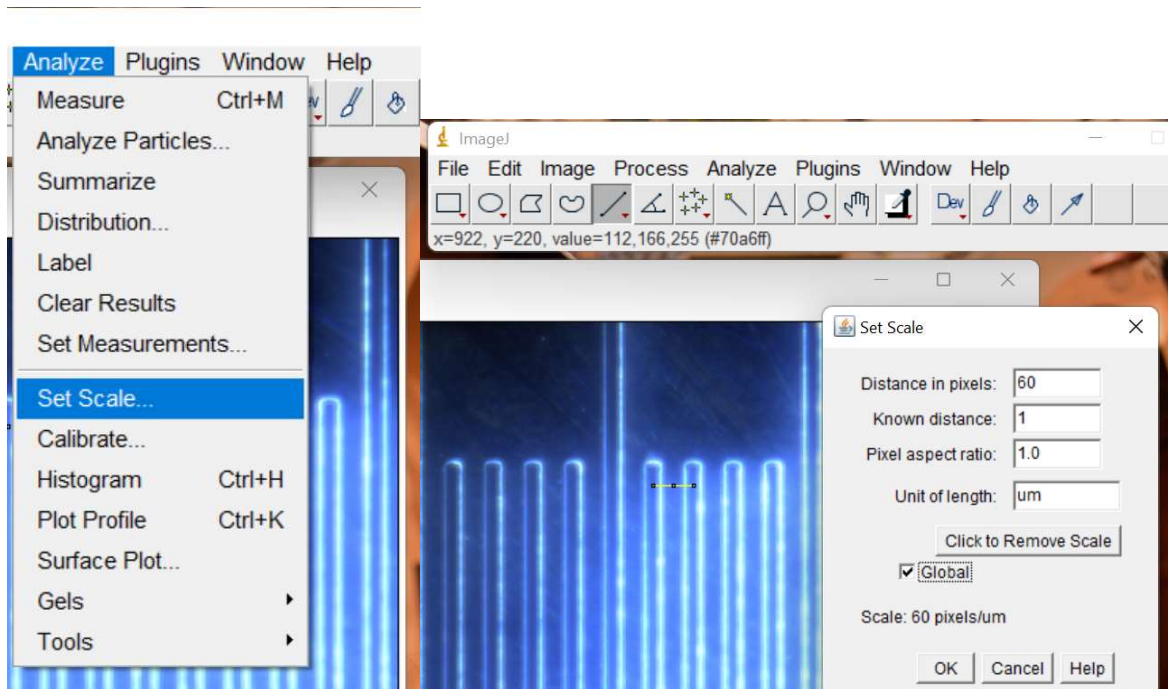


Figura 4.6 (A) Meniul programului ImageJ, (B) Fereastra “Set scale” pentru introducerea parametrilor.

După selectarea “Set scale” s-a deschis o fereastră pentru introducere de valori. Programul introduce automat valoarea dinstanței în pixeli, dintre două diviziuni, adică lungimea liniei trasate la început pe imagine. S-a introdus valoarea de $1 \mu\text{m}$ ca distanță deja determinată (conform lamelei cu diviziuni) și s-a bifat variabila “Global” (Fig. 4.6B).

Următorul pas a constat în deschiderea imaginilor dorite pentru scalare. Odată deschisă imaginea, din meniul programului se alege din nou “Analyze”, însă de această dată opțiunea “Tools”, “Scale bar” (Figura 4.7).

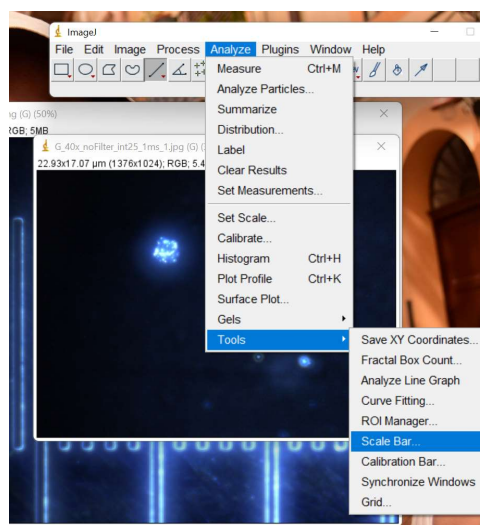


Figura 4.7 Print screen cu meniul “Analyze” al programului ImageJ

Fereastra “Scale bar” s-a redeschis, însă de această dată cu opțiuni de modificare a fontului și dimensiunii dorite în micrometrii a bării de scalare. Am lăsat valorile deja introduse automat de program, tot ce am modificat a fost lungimea de $2 \mu\text{m}$ a bării de scară (Figura 4.8).

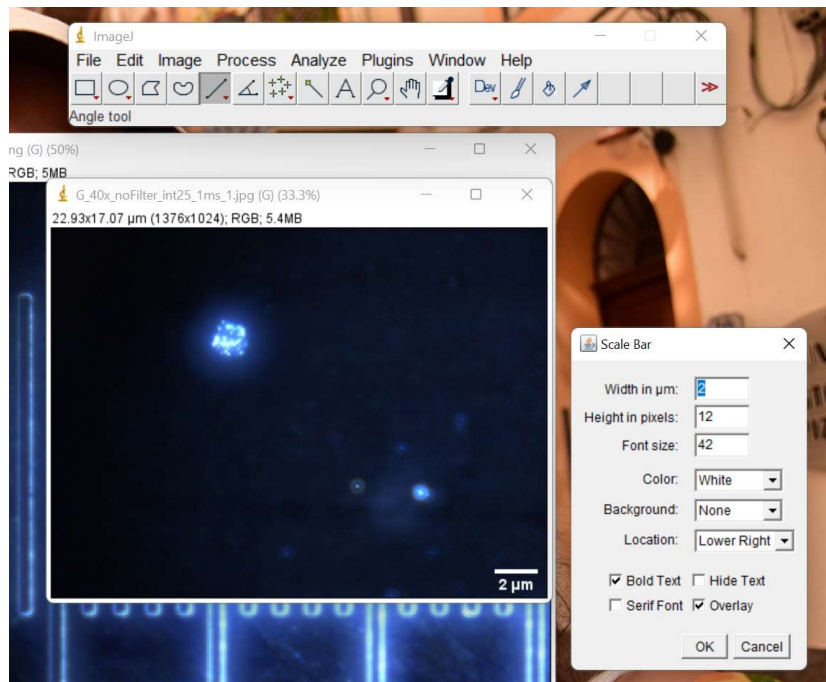


Figura 4.8 Print screen cu fereastra “Scale bar” și cu scara deja introdusă pe imagine

Acest proces a fost repetat pentru toate imaginile achiziționate cu obiectivul de 40x dar și pentru cel de 20x.

Determinarea numărului și dimensiunilor obiectelor de interes din fiecare probă au fost realizate de asemenea în programul ImageJ. S-a deschis pe rând câte o imagine din fiecare probă, din meniul “Image”-“Adjust” s-a setat ca imaginea să fie de tipul “8-bit”, apoi din același meniu s-a setat thresholdul, pentru conturarea obiectelor. Pentru a separa obiectele suprapuse s-a ales opțiunea “Watershed” din meniul “Process”. În final s-a selectat din meniul “Analyze” opțiunea “Analyze particles” și s-au deschis automat două ferestre, una cu obiectele numerotate și una cu un tabel de valori, ce conține dimensiunile obiectelor (Fig.4.9).

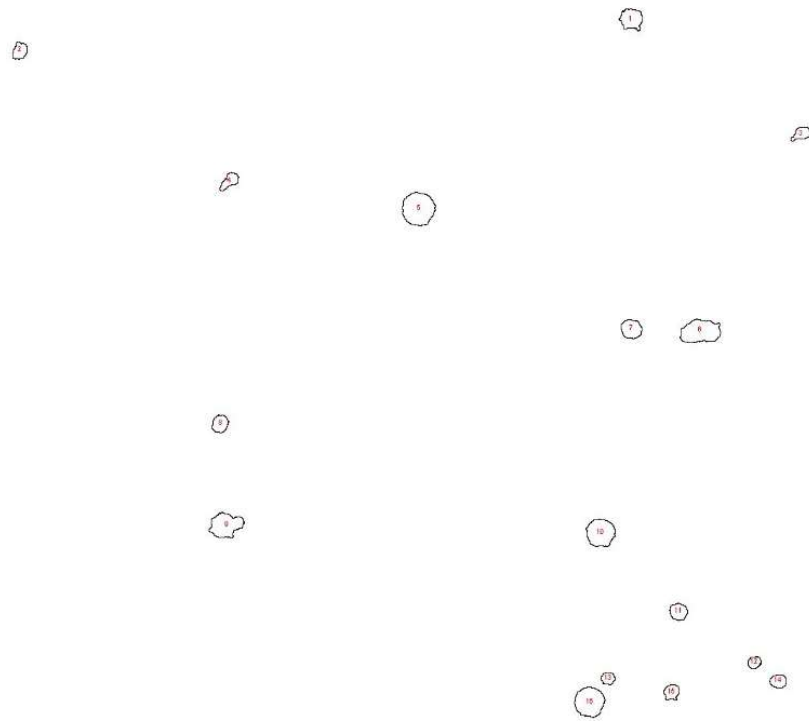


Figura 4.9 Obiectele numerotate din proba H3

Capitolul 5. Rezultate și comparații cu literatura de specialitate

5.1. Comparația imaginilor optice obținute

Pentru o comparație optică a probelor am realizat pentru fiecare probă un colaj de câte șase imagini. Din cele șase imagini, trei sunt achiziționate în fluorescență cu două filtre diferite și una fără filtru, una este achiziționată în câmp întunecat, iar ultimele două sunt achiziționate în contrast de fază, din care una este cu filtru polarizator.

Imaginile în fluorescență și cele în câmp întunecat (A, B, C, D de la fiecare probă) au fost achiziționate cu obiectivul de 40x, iar cele în contrast de fază, respectiv în contrast de fază cu filtru polarizator (E, F) au fost achiziționate cu obiectivul de 20x.

În urma analizei optice se poate observa în primul rând forma particulelor de interes, aceasta fiind una aproximativ rotundă pentru toate loturile de miere de salcâm.

- Proba lot H1:

În figura 5.1 imaginile achiziționate în fluorescență conțin obiecte cristalizate care emit autofluorescență, adică zaharul din miere s-a cristalizat împreună cu particulele de polen, formând cristale cum apar în Figurile 5.2A, 5.2B, 5.2C.

- Proba lot H2:

Pe imaginile din acest lot se poate observa că sunt similare la nivelul dimensiunilor particulelor de polen, aici neavând în imagine cristale.

- Proba lot H3:

Obiectele din această probă în fluorescență Fig. 5.3A, 5.3C, la fel ca și cele din proba H4 nu prezintă autofluorescență.

- Proba lot H4:

Pentru această probă la aplicarea filtrelor de emisie (Fig.5.4A, 5.4C) nu a fost detectată autofluorescența particulelor de polen la parcurgerea probei la microscop. În figurile 5.4A și 5.4C se poate observa un obiect cristalizat, însă care nu conține și particule de polen ca și în figurile 5.1A, 5.1C. Proba nu emite autofluorescență, aceasta doar reflectă lumina de excitație (se poate observa o culoare roșiatică a obiectului la aplicarea filtrului 2 Fig. 5.4C în loc de o culoare galbenă Fig. 5.3C).

- Proba lot H5:

Autofluorescența particulelor de polen se poate observa la această probă, însă în imaginile de fluorescență apare o conglomerare de particule, fapt ce la imaginile cu filtru Fig 5.5A și 5.5C

semnalul provenit de la obiecte se suprapune, astfel se creează o iluzie de un singur obiect mare, în loc de mici obiecte apropiate ca și în figura fără filtru 5.5B.

Omogenitatea și forma probelor în urma analizei optice era de așteptat teoretic, însă se confirmă și practic.

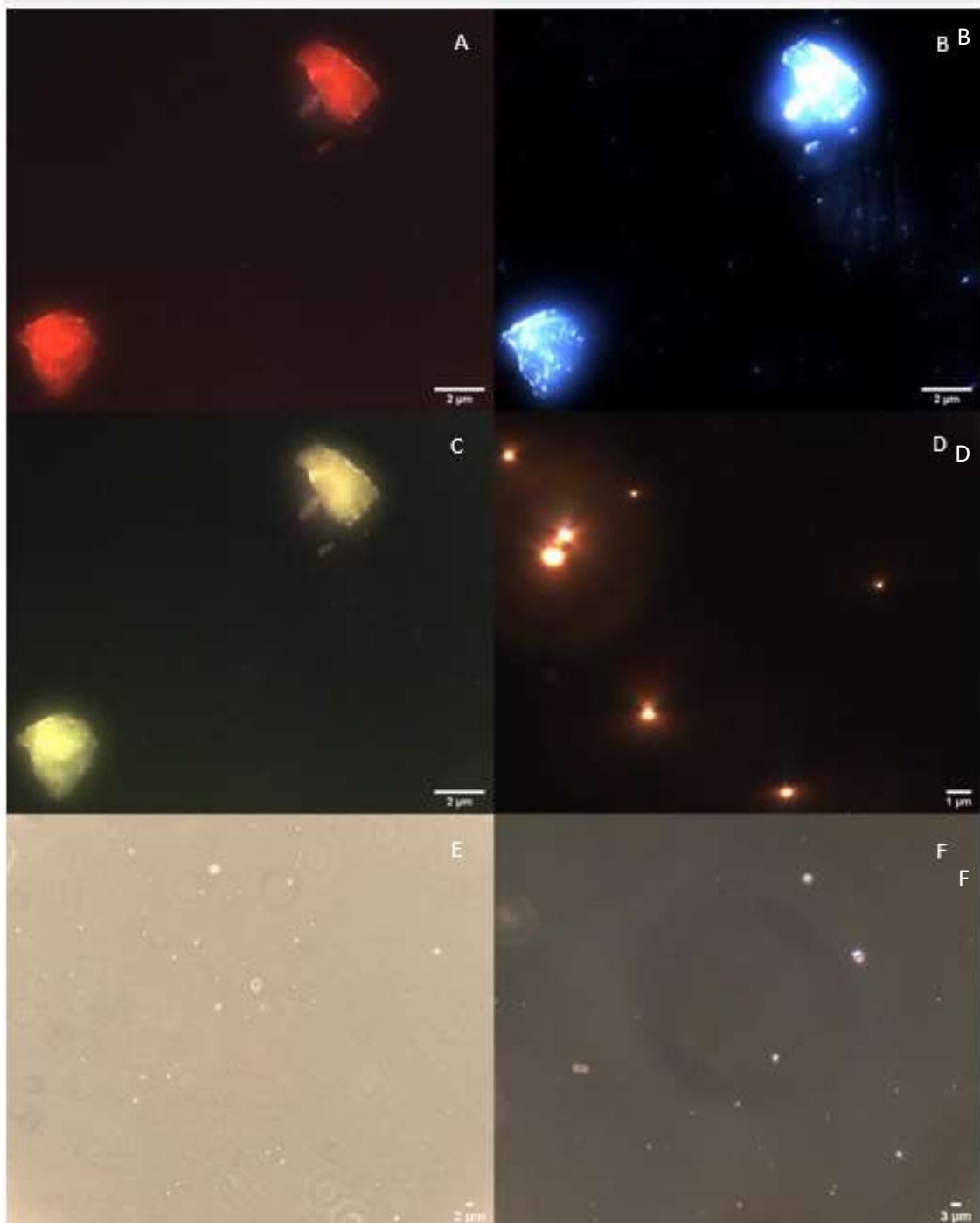


Figura 5.1 Imaginile achiziționate optic din lotul de miere H1 (A) autofluorescență, filtru 3, (B) autofluorescență fără filtru, (C) autofluorescență filtru 2, (D) câmp întunecat, (E) contrast de fază, (F) contrast de fază cu filtru polarizator

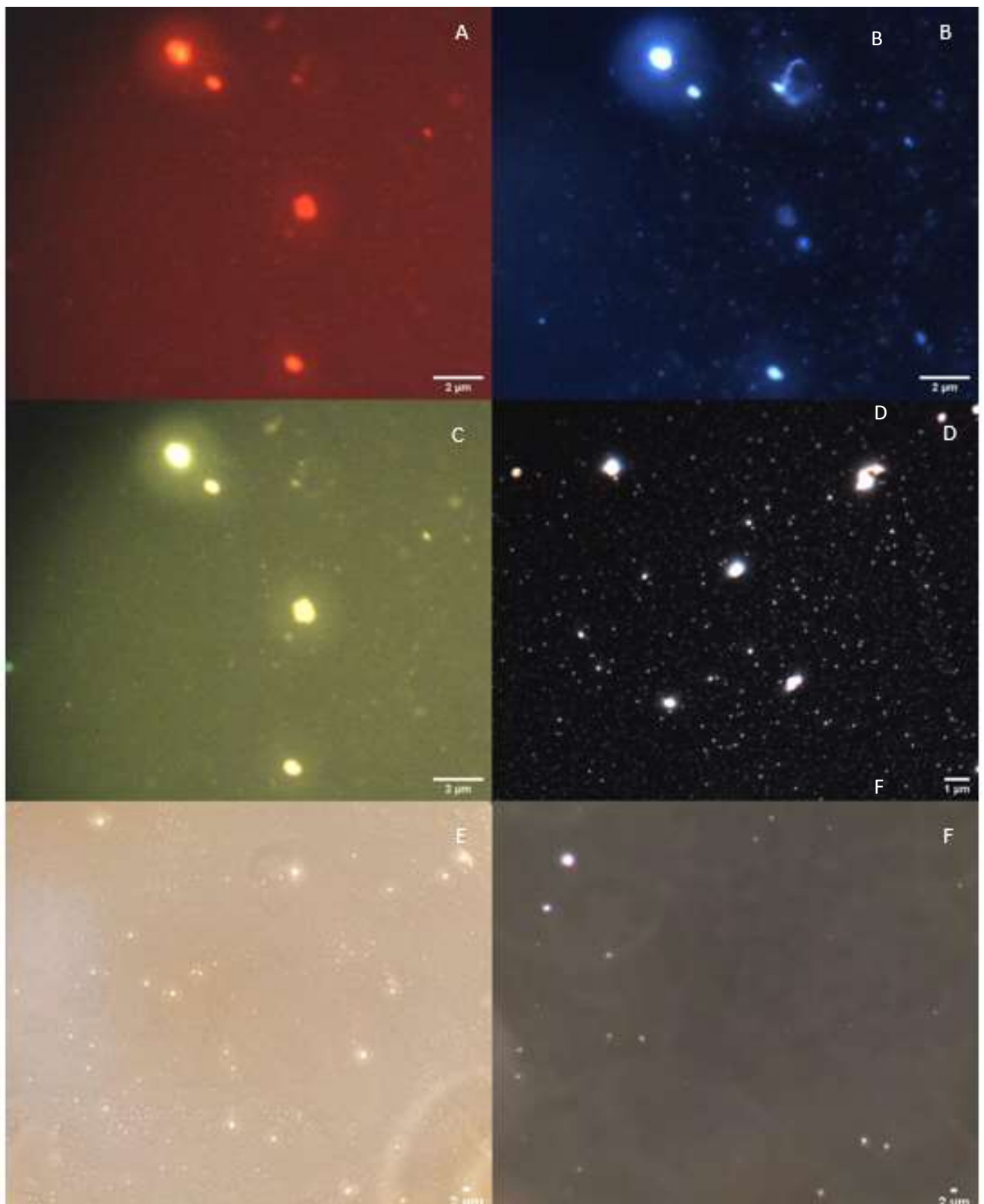


Figura 5.2 Imaginile achiziționate optic din lotul de miere H2 (A) autofluorescență, filtru 3, (B) autofluorescență fără filtru, (C) autofluorescență filtru 2, (D) câmp întunecat, (E) contrast de fază, (F) contrast de fază cu filtru polarizator



Figura 5.3 Imaginile achiziționate optic din lotul de miere H3 (A) autofluorescență, filtru 3, (B) autofluorescență fără filtru, (C) autofluorescență filtru 2, (D) câmp întunecat, (E) contrast de fază, (F) contrast de fază cu filtru polarizator

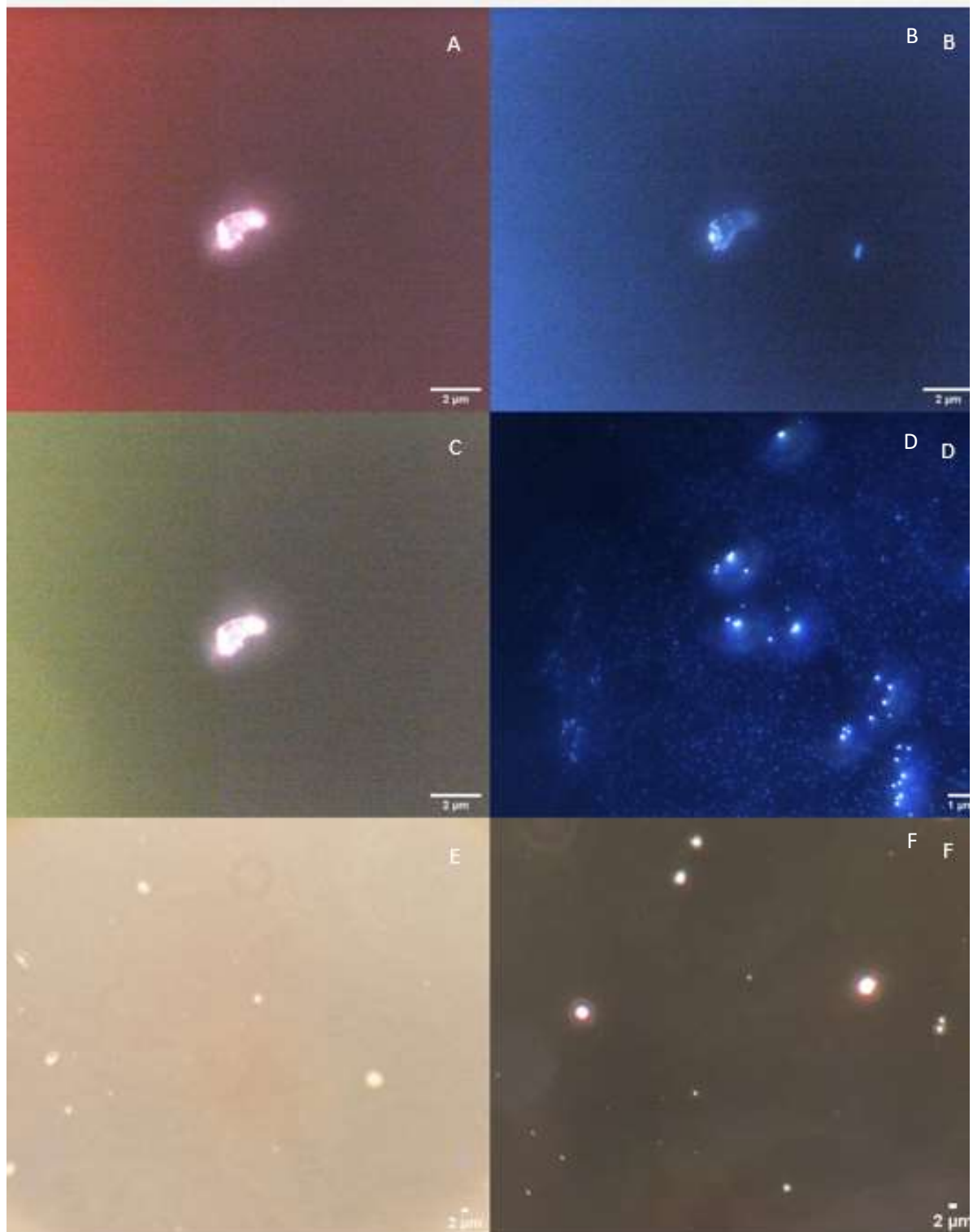


Figura 5.4 Imaginile achiziționate optic din lotul de miere H4 (A) autofluorescență, filtru 3, (B) autofluorescență fără filtru, (C) autofluorescență filtru 2, (D) câmp întunecat, (E) contrast de fază, (F) contrast de fază cu filtru polarizator

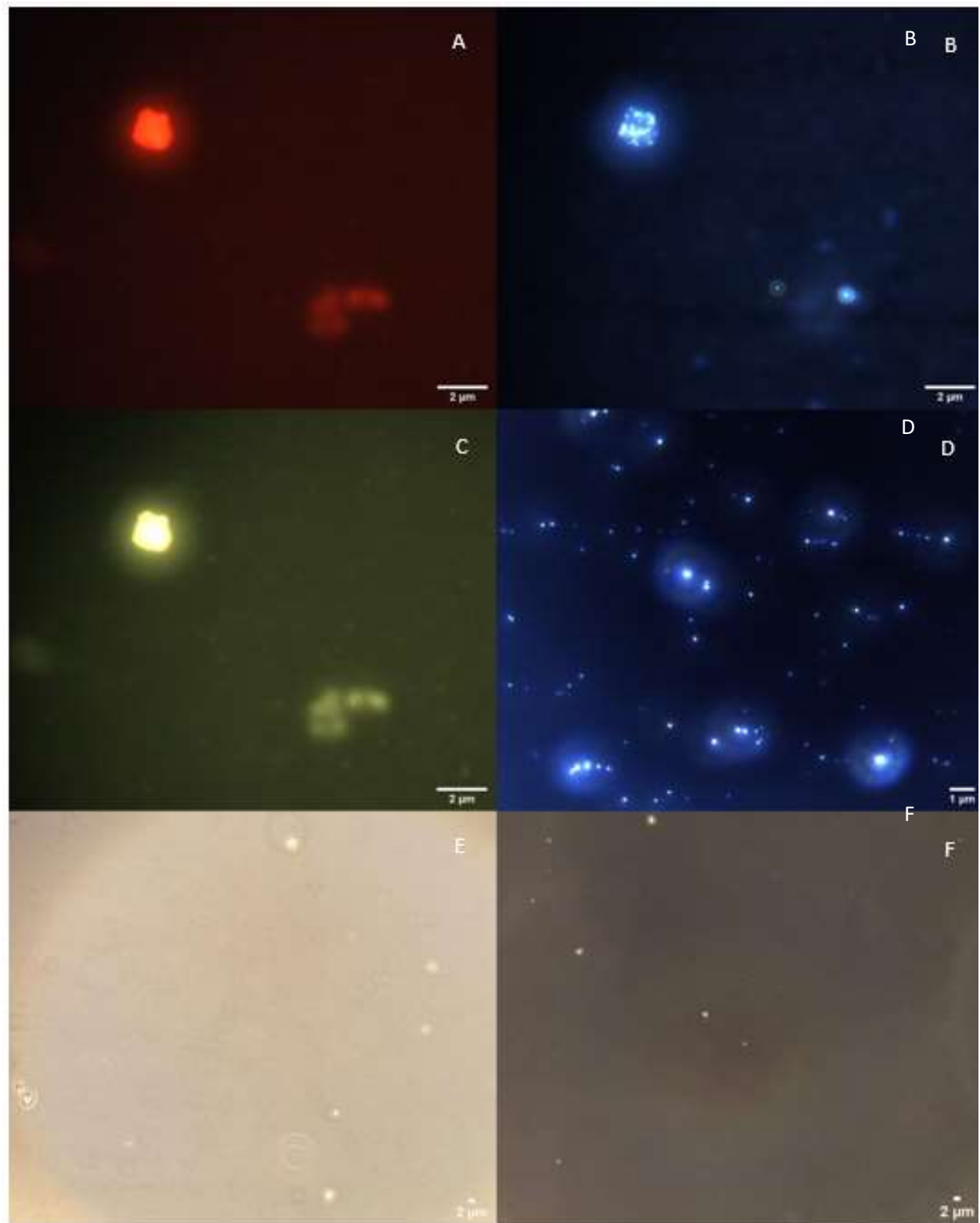


Figura 5.5 Imaginile achiziționate optic din lotul de miere H5 (A) autofluorescență, filtru 3, (B) autofluorescență fără filtru, (C) autofluorescență filtru 2, (D) câmp întunecat, (E) contrast de fază, (F) contrast de fază cu filtru polarizator

5.2. Analiza spectrală

Spectrele medii ale mierii de salcâm s-au obținut prin analiza spectrală medie în intervalul de lungimi de undă 400-1000 nm. Datele spectrale în formă ASCII provenite din selecția de ROI, au fost prelucrate în spectre în programul Matlab. Valorile la care era de așteptat să fie observate curbele spectrale sunt 420-580 nm și 700-950 nm conform [24]. După cum se poate observa în figurile 5.6-5.10 din spectrele individuale a celor 5 loturi, respectiv comparând figura cu spectrele medii (Figura 5.11) cu cea din literatura de specialitate (Figura 5.12), s-a obținut încadrarea spectrelor pe probele de miere de salcâm în intervalul valorilor curbelor spectrale specificate în articolul [24].

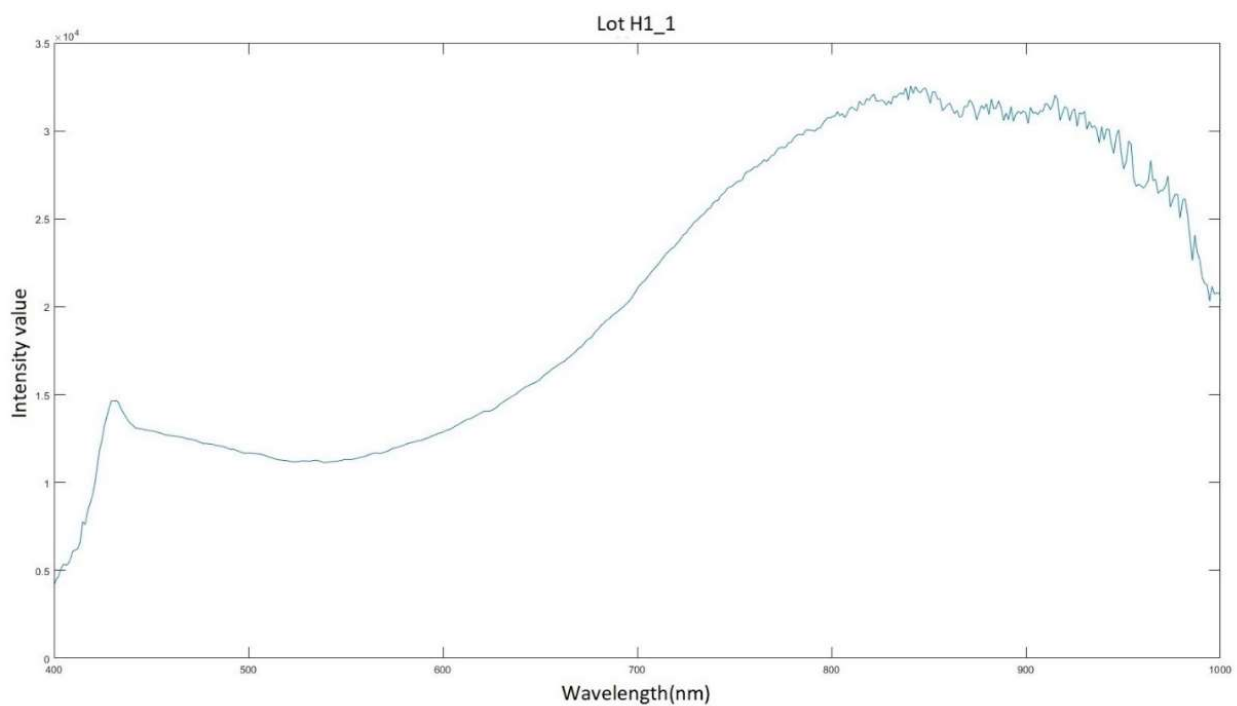


Figura 5.6 Spectrul mierii de salcâm lot H1

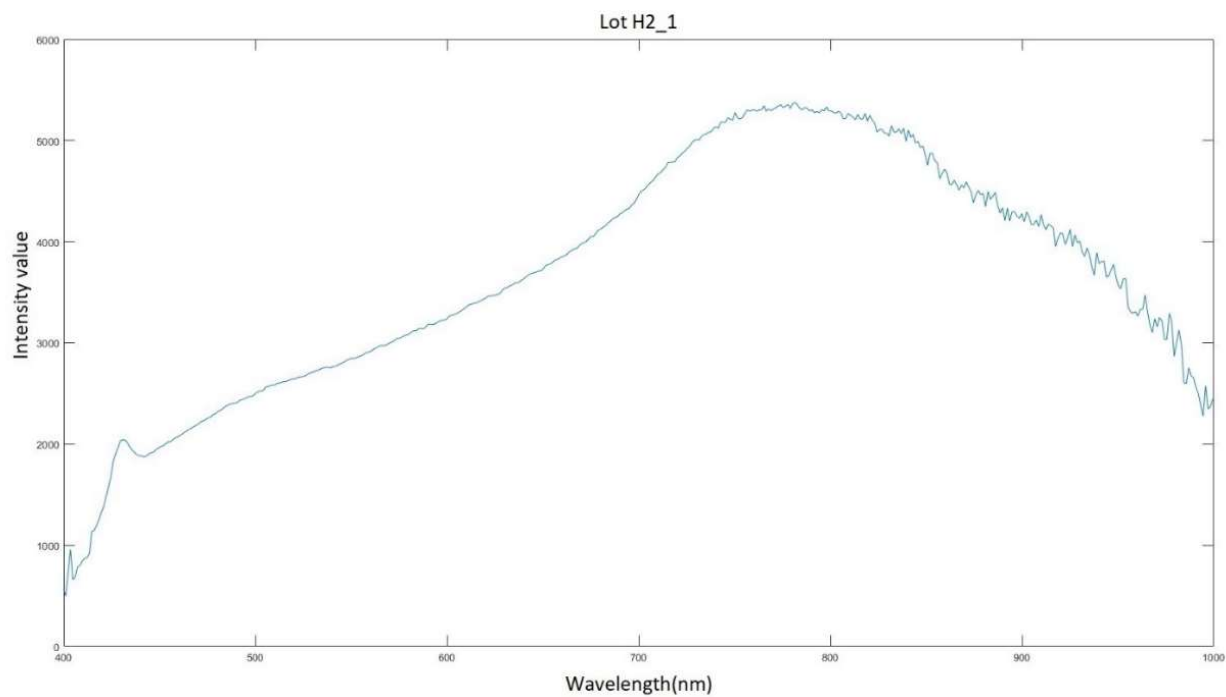


Figura 5.7 Spectrul mierii de salcâm lot H2

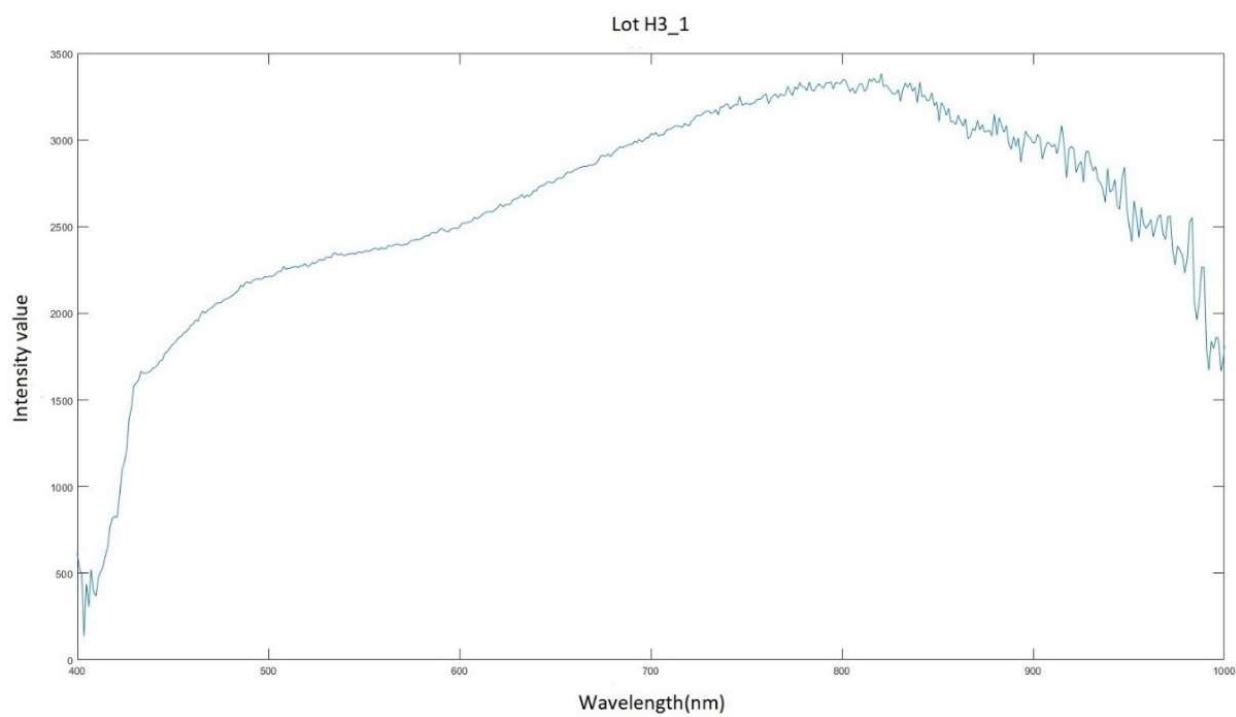


Figura 5.8 Spectrul mierii de salcâm lot H3

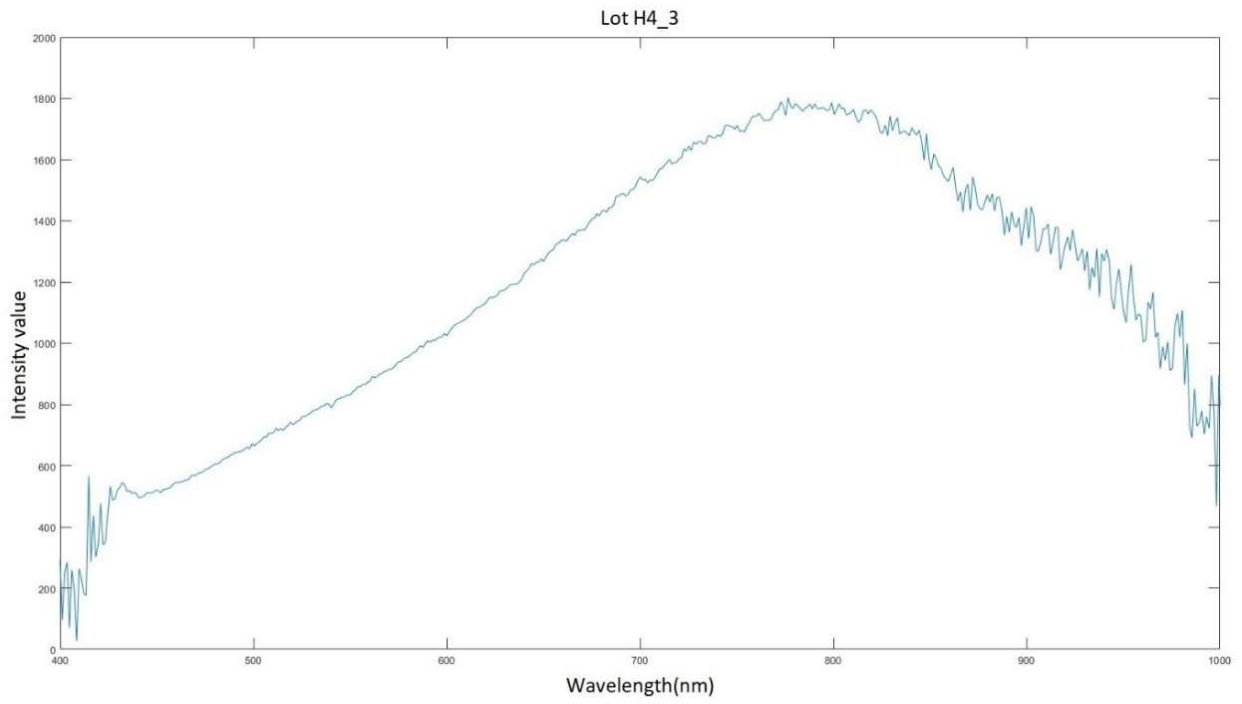


Figura 5.9 Spectrul mierii de salcâm lot H4

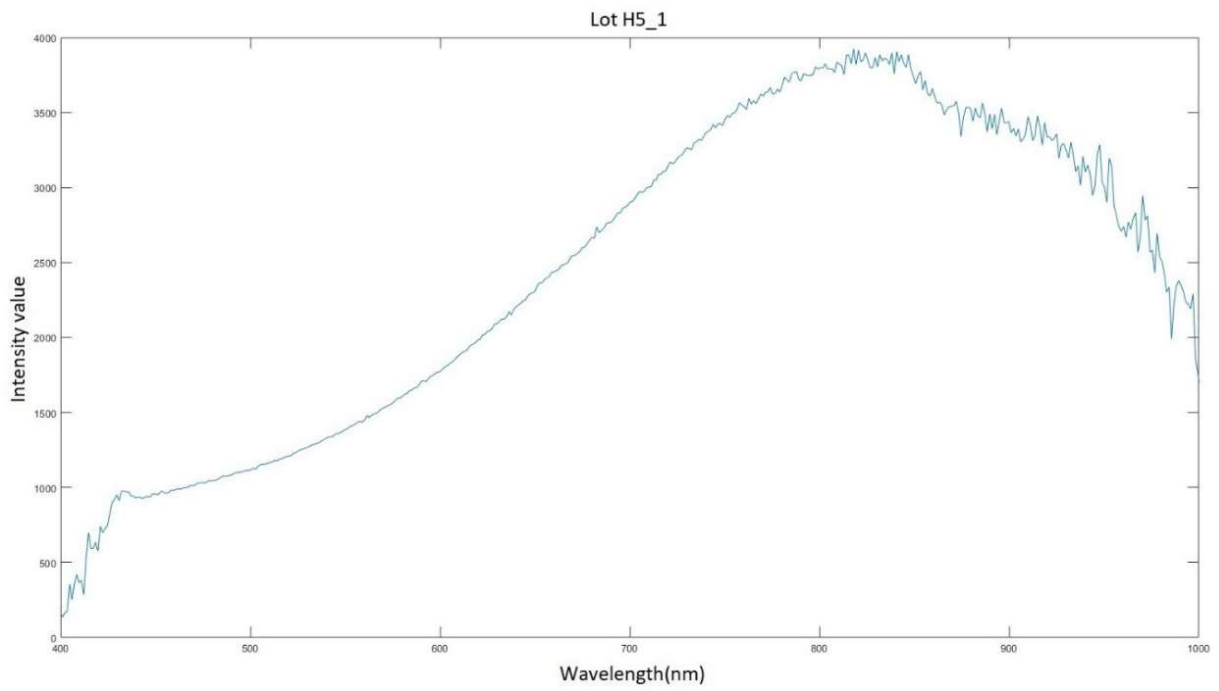


Figura 5.10 Spectrul mierii de salcâm lot H5

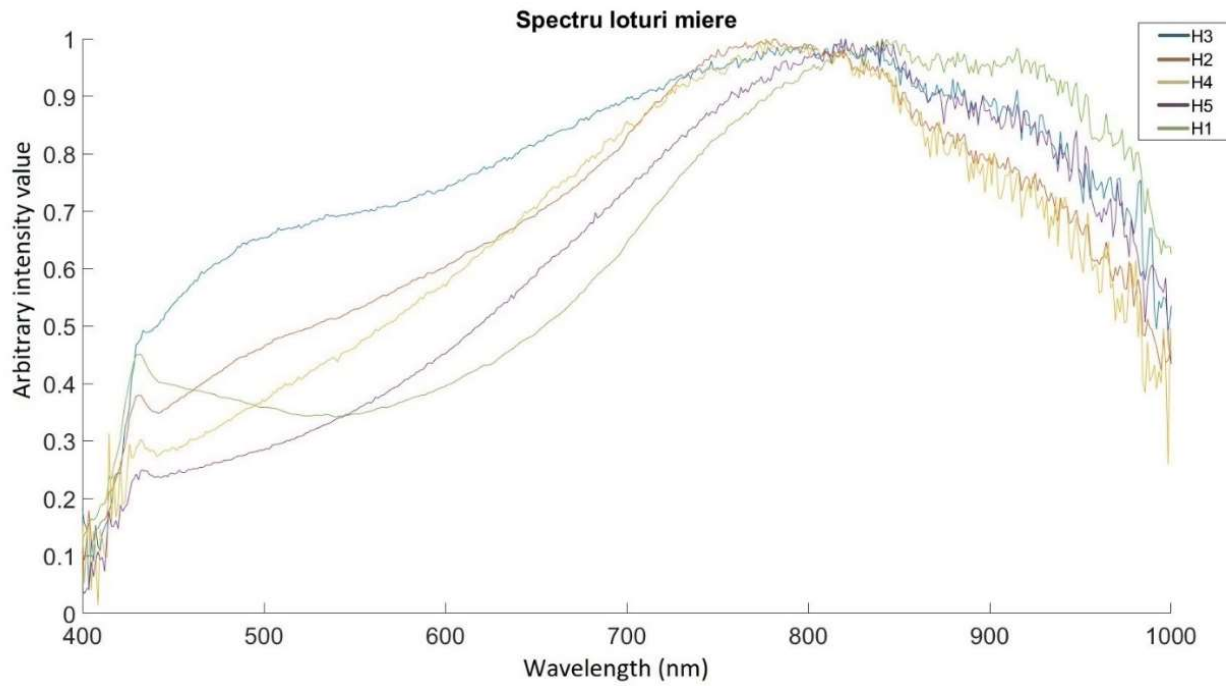


Figura 5.11 Spectrele loturilor de miere

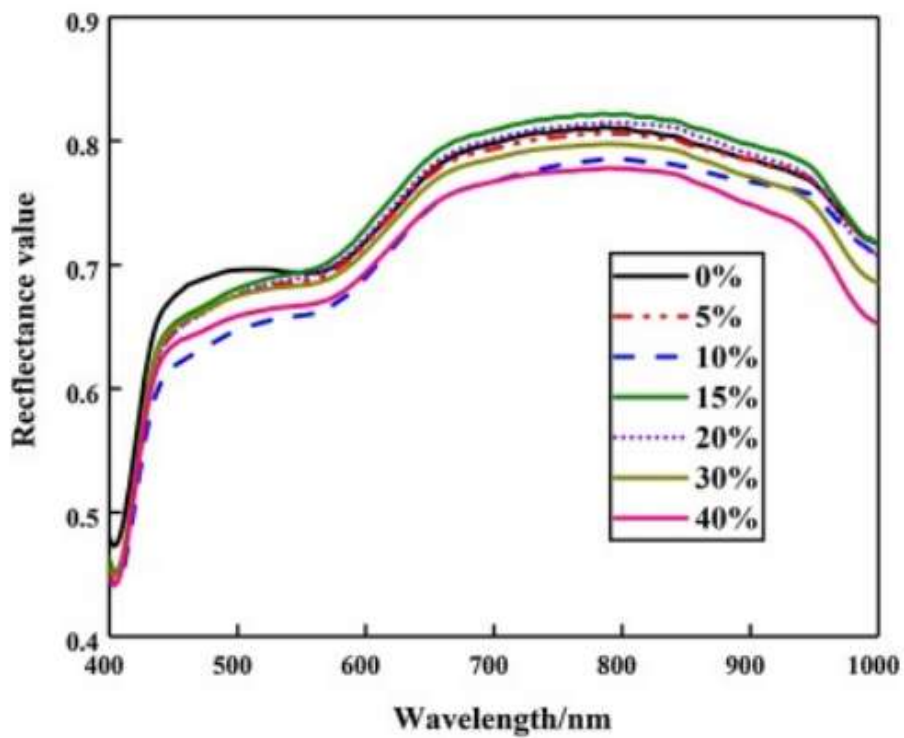


Figura 5.12 Spectrul loturilor de miere din articolul [24]

5.3. Caracteristici particule

Comparația loturilor de miere are la bază pe lângă o comparație optică și spectrală, una dimensională. Acest tip de analiză oferă informații despre dimensiunea particulelor de interes și numărul în care se găsesc în probă.

Pentru lungimea de undă de 800 ± 20 nm, în urma analizei PLC s-a determinat un anumit procentaj de pixeli. Acești pixeli sunt cei care emit semnal în intervalul 800 ± 20 nm. Numărul lor a fost normalizat la numărul total de pixeli din imagini, astfel obținându-se procentajele din tabelul 5.1.

În urma calculelor realizate pe baza informației analizate în ImageJ se poate observa pe baza tabelului 5.1 că loturile H1 și H4 au un procentaj mai mare al pixelilor care emit semnal la valoarea lungimii de undă egală cu 800 ± 20 nm, decât restul loturilor. Celelalte trei loturi de miere conțin un procentaj relativ asemănător de pixel ce emit semnal.

Tabel 5.1 Valorile numărului de pixel de pe imaginile probelor alături de procentaje

Lot probă	Număr imagine	Nr. Total de pixeli	Nr. Pixeli selectați	Procentaj pixeli ce au semnal la 800 ± 20 nm (%)
H1	1	484416	3833	0.79
	2		3268	0.67
	3		6880	1.42
	4		3329	0.69
	5		2806	0.58
H2	1		2743	0.57
	2		1192	0.25
	3		1720	0.36
	4		2264	0.47
	5		2239	0.46
H3	2		1612	0.33
	3		1265	0.26
H4	2		3413	0.70
	3		3093	0.64
	4		3633	0.75
	5		2383	0.49
H5	1		1531	0.32
	2		2225	0.46
	3		1704	0.35
	4		2587	0.53
	5		1389	0.29

Tabel 5.2 Dimensiunile și numărul obiectelor din probe

Lot probă	Număr imagini/probă	Număr total pixeli ROI	Număr obiecte/imagini	Media dimensiunilor particulelor/imagini (pixeli ²)
H1	1	948	12	369.5
	2	693		
	3	733		
	4	507		
	5	592		
H2	1	318	17	713.6
	2	401		
	3	136		
	4	265		
	5	197		
H3	1	114	16	615.5
	3	77		
	4	91		
	5	87		
H4	2	241	38	79.1
	3	113		
	4	119		
H5	1	83	52	76.23
	2	49		
	3	17		
	4	150		
	5	130		

Numărul de obiecte din fiecare lot împreună cu numărul total de pixeli din regiunile de interes analizate și media dimensiunilor particulelor din fiecare imagine, sunt prezentate în tabelul 5.2. Aici se observă că loturile H4 și H5, acestea fiind loturile de miere achiziționate de la magazinele bio, au un număr mai mare de obiecte egal cu 38 și 52 de particule, față de cele din supermarket-uri care conțin aproximativ 12-17 de particule. În ciuda numărului mare de obiecte conținute de probele bio, dimensiunile particulelor sunt mai reduse, cu valori medii de 76 respectiv 79 de pixeli², față de restul loturilor care conțin particule cu o medie a dimensiunilor cuprinsă între 300 și 700 de pixeli².

Concluzii

Lucrarea a avut ca obiectiv analiza hiperspectrală dar și microscopică a mierii de albine, mai exact a mierii de salcâm. S-au folosit cinci probe din loturi diferite de miere de salcâm. Trei dintre loturi au fost achiziționate din supermarket-uri, iar două au fost achiziționate din magazine bio. Dispozitivele microscopice folosite sunt microscopul în câmp întunecat, în fluorescență, în contrast de fază convențional și cu filtru polarizator, respectiv microscopul hiperspectral CytoViva.

Analiza imaginilor achiziționate s-a realizat cu ajutorul programelor ImageJ și ENVI, pentru a putea caracteriza fiecare lot de miere și de a realiza o comparație la nivelul particulelor de polen din fiecare probă. S-au creat regiuni de interes din fiecare imagine a probelor de polen. Pe baza informației spectrale obținută din pixelii conținuți de particulele de polen, s-a realizat o analiză mai amănunțită a loturilor de miere selectând regiunile imaginilor cu spectre la o anumită lungime de undă. Aceste regiuni au fost evidențiate și s-au calculat procentajul pixelilor cu semnal la lungimea de undă de $800 \pm 20\text{nm}$.

Din analiza optică a imaginilor, se poate observa o asemănare a particulelor de polen din cele cinci loturi în ceea ce privește forma acestora, ovală sau rotundă. Dimensiunea obiectelor diferă, unele având o mărime mai redusă decât altele. Loturile de miere bio conțin mai multe particule de polen și cu o dimensiune mai redusă. Semnătura spectrală a mierii de salcâm obținută cu ajutorul sistemului CytoViva confirmă curbele spectrale ale absorbției particulelor de polen obținute deja în literatură, acestea situându-se între 420-580 nm și, respectiv 600-950 nm.

Imagistica hiperspectrală împreună cu tehnicile microscopice menționate în lucrare s-au dovedit a fi folositoare pentru analiza mierii de salcâm. Aceste tehnici sunt accesibile, nu necesită timpi de achiziție îndelungați și oferă informații calitative în ceea ce privește probele analizate.

Bibliografie

- [1] Da-Wen Sun, *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*, Elsevier, Jun 29, 2010, Technology & Engineering, 496 pages, pagina XIII, paginile 3-4, 8-9
- [2] <https://www.microscopeclub.com/dark-field-microscopy/>, accesat la data de 12.03.2022
- [3] <https://www.olympus-lifescience.com/en/discovery/what-is-darkfield-microscopy/> accesat la data de 12.03.2022
- [4] <https://microbeonline.com/dark-field-microscopy/> accesat la data de 01.05.2022
- [5] Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D., *Fluorescence microscopy*, Cold Spring Harbor protocols, 2014
- [6] <https://www.britannica.com/science/fluorescence> accesat la data de 01.05.2022
- [7] <https://microbenotes.com/fluorescence-microscope-principle-instrumentation-applications-advantages-limitations/> accesat la data de 27.04.2022
- [8] Aluxa, *Imaging and Microscopy Fluorescence filters*, AZoOptics, <<https://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=1839>>, accesat la data de 01.05.2022
- [9] <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>, accesat la data de 01.05.2022
- [10] <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/polarization/>, accesat la data de 25.05.2022
- [11] F. Vasefi, N MacKinnon, D.L. Farkas, *Imaging in Dermatology*, Elsevier, 2016, pp.187-201.
- [12] Armin Schneider, Hubertus Feussner, *Biomedical Engineering in Gastrointestinal Surgery*, Academic Press, 2017
- [13] Ana M. Jiménez-Carvelo, et al., *Food Authentication and Traceability*, Academic Press, 2021
- [14] Sam Lawrence, *Enhanced Darkfield Optical Microscopy Opens New Nano-Scale Imaging Possibilities*, *Microscopy Today*, 29, 1, pp. 50–55, 2021.
- [15] <https://www.olympus-lifescience.com/en/discovery/enhanced-darkfield-illumination-label-free-imaging-at-the-nanoscale/>, accesat la data de 27.04.2022

- [16] <https://www.cytoviva.com/hyperspectral-image-acquisition>, accesat la data de 27.04.2022
- [17] Maxleene Sandasi, Ilze Vermaak, Weiyang Chen and Alvaro M. Viljoen, *Hyperspectral Imaging and Chemometric Modeling of Echinacea — A Novel Approach in the Quality Control of Herbal Medicines*, *Molecules*, 19, 13104-1312, 2014.
- [18] <https://www.cytoviva.com/cytoviva-hyperspectral-microscope>, accesat la data de 01.05.2022
- [19] CytoViva, Inc., CytoViva-User-Manual, 2016 < <https://cytoviva.com/wp-content/uploads/2016/04/HSI-User-Manual-8-11-11r.pdf>> accesat la data de 01.05.2022
- [20] Marghitas, L. A. et al., *The Development of a Biochemical Profile of Acacia Honey by Identifying Biochemical Determinants of its Quality*, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2), 84-90, 2010.
- [21] Mihaela Emanuela Crăciun, Oana Cristina Pârvulescu, Andreea Cristina Donise, Tănase Dobre & Dumitru Radu Stanciu, *Characterization and classification of Romanian acacia honey based on its physicochemical parameters and chemometrics*, *Scientific Reports*, volume 10, Article number: 20690, 2020.
- [22] Aliyu Muhammad, Oyeronke A. Odunola, Mohammed A. Ibrahim, Abdullahi B. Sallau, Ochuko L. Erukainure, Idowu A. Aimola, Ibrahim Malami, *Potential biological activity of acacia honey*, *Frontiers in Bioscience, Elite*, 8, 351-357, 2016.
- [23] <https://www.chroma.com/products/sets/69002-et-dapi-fitc-texas-red#tabs-0-main-1>, accesat la data de 28.05.2022
- [24] Yuanyuan Shao, Yukang Shi, Guantao Xuan, Quankai Li, Fuhui Wang, Chengkun Shi, Zhichao Hu, *Hyperspectral imaging for non-destructive detection of honey adulteration*, *ScienceDirect, Vibrational Spectroscopy*, Volume 118, January 2022, 103340