

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Conf. dr. Dana Maniu

Absolvent

Șarpe-Mîrzan Florina-Irina

2024

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Studiul fluorescenței uleiului de măsline

Coordonator științific

Conf. dr. Dana Maniu

Absolvent

Șarpe-Mîrzan Florina-Irina

2024

ABSTRACT

In this study, the fluorescence spectra of three extravirgin olive oil samples were investigated and subsequently compared with those of sunflower oil and olive pomace oil. It was desired to verify as accurately as possible the compounds present in the oil without the possibility of artifacts caused by dilution of the oil in solvents. Thus, the oils were analyzed without treating or preparing them in advance. After the absorption maxima were found at 412 nm, 454 nm, and 482 nm, the main measurements could be carried out for the epifluorescence front-face method. To satisfy scientific curiosity, the wavelength of 365 nm which, based on UV-VIS analysis, was found to be outside the UV-Vis spectrum of extra virgin olive oil, but present in the absorption spectral results of sunflower oil, was used. During the course of the study it was shown that despite the weak emission in this area, amounts of chemical compounds of olive oils were detected at 365 nm excitation.

By correlating the results to previous studies carried out for the characterization of the compounds of this oil, we were able to detect their presence at certain wavelengths. A fluorescence at 365 nm and 412 nm was found, indicating an amount of chlorophylls with important contributions from carotenoids and possibly tocopherols as well as phenolic chemicals in extra virgin olive oils. The variations, compounds, present among the three extra virgin olive oil samples proved the major influence of the origin and extraction process of the olive oils. In spectrum research, olive pomace oil had outstanding fluorescence properties. It had a peak at 440 nm for excitation at 365 nm, which might be attributed to chlorophyll a, and one at 460 nm for excitation at 412 nm, which was connected with chlorophyll b. The peak at 520 nm for excitation at 454 nm was attributed to pheophytin, while the peak at 530 nm for excitation at 482 nm was thought to be a lutein sharer. On the other hand, sunflower oil surprised by the presence in a higher number of carotenoids. These distinctions can be used to identify and classify different types of vegetable oils based on their fluorescence spectra, revealing important information about their chemical composition and quality. The differences in the spectra of the 5 oils analyzed were also highlighted, showing that each oil has a unique spectral fingerprint.

Cuprins

Introducere.....	5
Capitolul I: Noțiuni generale.....	7
I.1. Fluorescența.....	7
I.2. Metode folosite în spectroscopia de fluorescență	10
I.3. Uleiul de măsline.....	13
I.4. Studii de fluorescență asupra uleiului de măsline	15
Capitolul II: Materiale și metode	21
II.1 Materiale.....	21
II.2 Metode	23
Capitolul III: Rezultate și discuții.....	24
III.1 Investigarea comportamentului fluorescent a uleiurilor extravirgine de măsline....	27
III.2 Investigarea comportamentului fluorescent a uleiurilor de floarea-soarelui și turte de măsline	32
III.3 Concluzionarea datelor înregistrate pentru toate probele	34
Concluzii și perspective	37
a. Concluzii.....	37
b. Perspective.....	37
Bibliografie	39
Anexe	44
Anexa 1- Spectrometru de fluorescență; StellarNet Inc.....	44
Anexa 2- Spectrofotometru cu dublu fascicul tip UV-VIS V-750; Jasco	45
Anexa 3- Spectrofluorimetru FP-8000; Jasco	46

Introducere

Fluorescența uleiului de măsline este importantă în evaluarea autenticității și calității acestuia, deoarece poate dezvălui informații despre compoziția chimică, precum și despre prezența anumitor molecule, cum ar fi polifenolii și carotenoizii, care sunt markeri ai prospețimii și purității. Uleiul de măsline, în special uleiul de măsline extravirgin, are mai multe beneficii pentru sănătate, inclusiv caracteristici antioxidante, antiinflamatorii și cardioprotectoare, datorită concentrației sale ridicate de acizi grași mononesaturați și de substanțe bioactive. Aceste beneficii au rolul de a reduce riscul de boli cardiovasculare, de a îmbunătăți funcția cognitivă și de a proteja împotriva anumitor tumori maligne. Analiza prin fluorescență poate detecta adulterarea și amestecurile care includ uleiuri de calitate inferioară, protejând astfel clienții și menținând standardele de calitate ale pieței. Este un instrument util pentru cercetători și producători în vederea optimizării metodelor de extracție și conservare, rezultând un produs finit de înaltă calitate cu cele mai mari avantaje pentru sănătate. În industria uleiului de măsline, clasificarea rapidă a uleiului de măsline de morărit este esențială pentru a distinge produse distincte pe baza calităților lor, asigurând identificarea, calitatea și trasabilitatea. Abordarea prin epifluorescență este necesară pentru o analiză completă și nedistructivă a compoziției uleiului, deoarece permite citiri exacte și continue pe care metodele analitice tradiționale nu le pot oferi.

Lucrarea prezentă are obiectivul de a investiga fluorescența uleiului de măsline extravirgin cu ajutorul metodei epifluorescenței frontale, utilizând un Spectrofluorimetru FP8000, Jasco, și atribuirea pe baza studiilor de specialitate, fiecărei benzi specifice de fluorescență o cantitate de constituenți chimici ai uleiurilor. Spectrele au fost comparate cu cele ale uleiului de floarea-soarelui și cel de turte de măsline, pentru evidențierea cantităților de compuși chimici și evidențierea amprentei unice. Au fost realizate măsurători în vederea găsirii maximelor de absorbție cu ajutorul unui spectrofotometru cu dublu fascicul tip UV-VIS (V-750 Jasco). Cercetarea a fost desfășurată în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, Cluj-Napoca și în cadrul Universității Babeș- Bolyai. Lucrarea s-a realizat pe trei capitole substanțiale.

Primul capitol înlobează eficiența metodei de fluorescență frontală și epifluorescență frontală în vederea analizei uleiului, atât cantitativ, prin reducerea cantității necesare pentru investigare, fiind nevoie de un volum mic pentru furnizarea unui set complet de date, cât și calitativ, oferind informații precise despre uleiuri, nefiind nevoie de tratarea care să ducă la formarea de artefacte.

De asemenea, tot aici sunt subliniate și proprietățile nutritive ale uleiului de măsline pentru sănătate, în special în cazul colesterolului ridicat și prevenirea bolilor cardiovasculare.

Cel de-al doilea capitol cuprinde prezentarea fiecărui tip de ulei supus investigării, fiind un total de 5 uleiuri vegetale, printre care 3 de măsline extravirgin, iar celelalte două de floarea-soarelui și de turte de măsline. Metodele și aparatura utilizată în vederea atingerii scopului au fost de asemenea menționate în această parte.

În cel de-al treilea capitol, s-au interpretat rezultatele experimentale. Pe baza studiilor de specialitate realizate în vederea investigării componentelor chimice prezente în ulei, am atribuit vârfurilor spectrelor de fluorescență rezultate, un compus și concentrația acestora. S-au comparat uleiurile, accentuându-se caracterul unic al fiecăruia.

În cadrul concluziilor și perspectivelor am sumarizat idei importante din cadrul lucrării și îmbunătățiri pentru maximizarea rezultatelor și metodei.

Capitolul I: Noțiuni generale

I.1. Fluorescența

Luminescența este un fenomen care constă în emisia de fotoni din stări excitate electronic. Principalele subcategorii diferențiate prin tipul de energie excitatoare ale acesteia fiind: bioluminiscenta, chemiluminiscenta, electroluminiscenta, fosforescența și fluorescența, trecute în tabelul I.1.

Tabelul I.1. Principalele forme de luminescență [1]

<u>Tipul de luminescență</u>	<u>Tipul de energie care o induce</u>
Bioluminiscenta	Reacții biochimice
Chemiluminiscenta	Reacții chimice
Electroluminiscenta	Câmpuri electrice
Fluorescența	Unde electromagnetice din domeniul UV-Vis
Fosforescența	Unde electromagnetice din domeniul UV-Vis

În cazul fosforescenței, emisia unui foton are loc atunci când starea excitată electronic este o stare de triplet (adică electronul de pe nivelul excitat are spin paralel cu electronul de pe nivelul fundamental, neexcitat).

Fluorescența, pe de altă parte, constă în emisia unui foton în urma dezexcitării unui nivel electronic de singlet (electronul de pe nivelul excitat are spin antiparalel cu electronul de pe nivelul fundamental). Tranziția electronică corespunzătoare emisieii de fluorescență este foarte rapidă, cu viteze apropiate de $10^8 \text{ secunde}^{-1}$. Deci, durata emisieii de fluorescență, este mică, de aproape 10^{-8} secunde sau 10 nanosecunde. Ca urmare, timpul de viață al nivelului excitat electronic este, în majoritatea cazurilor de ordinul 10 al nanosecundelor [2]. Aceasta (fluorescența) se caracterizează prin sensibilitatea și specificitatea sa. Este rapidă, neinvazivă și rentabilă, fără pregătire a probei și fără emisii. Este considerat un instrument promițător pentru monitorizarea procesului și reglarea parametrilor esențiali pe parcursul producției, pentru a satisface în mod eficient standardele de calitate și siguranță necesare.[3]

Încă din secolul XX domeniul spectroscopiei a stârnit curiozitatea cercetătorilor, printre ale căror nume s-au remarcat cele ale fizicianului polonez Aleksander Jabłoński și a fizicianului francez Jean Baptist Perrin alături de fiul său Francis Perrin care au adus contribuții semnificative teoriei fluorescenței introducând conceptul de transfer de energie rezonantă între molecule și elaborând o teorie pentru a explica fluorescența întârziată activată termic [4] ilustrând ulterior pentru simplitate teoria într-o diagramă cunoscută drept: "Diagrama Jablonski", figura I.1.

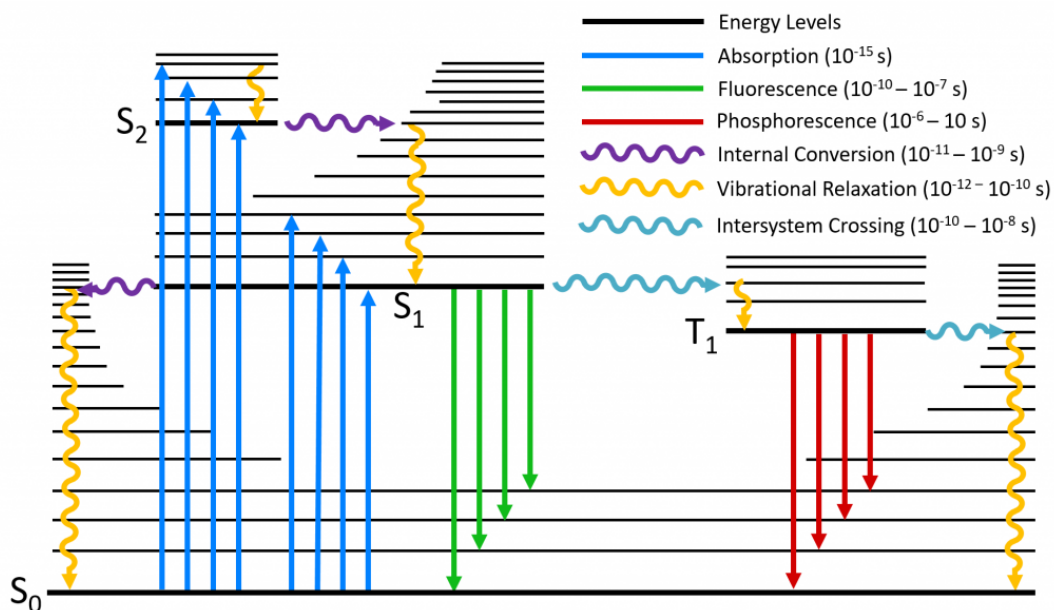


Figura I.1. Diagrama Jablonski explicând apariția fluorescenței și fosforescenței în urma excitării electronilor de la starea fundamentală singlet (S₀) la prima stare excitată singlet (S₁).[5]

În această diagramă sunt prezentate principalele procese care apar în cazul emisiei de fluorescență sau de fosforescență: absorbția luminii, relaxarea vibrațională, conversia internă, trecerea între sisteme ("intersystem crossing"), emisia de fluorescență și fosforescență, precum și nivelele electronice și vibraționale implicate în aceste procese. În plus, fiecare strat electronic conține un număr de niveluri vibraționale, iar fiecare nivel vibrațional poate fi subdivizat în niveluri rotaționale; emisia de fluorescență implică doar schimbarea stării vibraționale deodată cu schimbarea stării electronice. La temperatura camerei, majoritatea moleculelor se află în starea electronică fundamentală, pe nivelul electronic S₀ și pe nivelul vibrațional $v = 0$. Diferitele tipuri de tranziții electronice pot fi observate în diagramă prin săgeți verticale sau transversale. Există două tipuri de procese de dezexcitare: neradiative (conversie internă sau relaxare vibrațională) și

radiative (fluorescență și fosforescență - transfer de energie între două stări electronice). Procesul de fluorescență se încheie atunci când unda electromagnetică excitatoare nu mai este prezentă, fiind considerat un proces scurt. Tranziția S_0-0 (de la nivelul vibrațional fundamental al stării electronice fundamentale la S_1-0 (nivelul vibrațional fundamental al primei stări electronice excitate) este cea mai comună, în timp ce celelalte tranziții necesită mai multă energie. Absorbția de energie întrebuințată pentru a aduce o moleculă în starea excitată nu afectează semnificativ distanțele internucleare ale moleculei. Distribuția nivelurilor vibraționale rămâne similară în ambele cazuri, ceea ce permite ca spectrul de fluorescență să fie considerat imaginea în oglindă a spectrului de absorbție (atunci când spectrele sunt reprezentate în numere de undă). Ca urmare a pierderii de energie în starea excitată cauzată de relaxarea vibrațională, energia emisiei de fluorescență este mai mică decât energia absorbită. Cu alte cuvinte, fotonii emiși au o lungime de undă mai mare decât cea a fotonilor absorbiți, ceea ce este cunoscut sub numele de deplasarea Stokes [6]. Utilizarea spectroscopiei de fluorescență pentru a stabili noi metodologii analitice în analiza alimentelor a stârnit interesul cercetătorilor și al întreprinderilor din domeniul alimentar. Acest lucru se datorează, în majoritatea cazurilor, interesului tot mai mare al publicului pentru standarde de înaltă calitate în aplicațiile alimentare; a devenit vitală obținerea de informații calitative și cantitative despre materiile prime, produsele intermediare și finale pentru o prelucrare optimă [7]. Spectroscopia de fluorescență are numeroase utilizări în analiza alimentelor. Principalele aplicații asupra alimentelor, incluzând caracterizarea produselor alimentare, fiind: identificarea modificărilor termice în timpul procesării, detectarea falsificării, monitorizarea originii geografice, detectarea autenticității, monitorizarea proprietăților chimice și reologice, determinarea deteriorării microbiene și detectarea oxidării lipidelor în alimente. Capacitatea de detectare a spectroscopiei de fluorescență depinde de prezența unor fluorofori distincți în diferite alimente.

Figura I.2 rezumă prezența fluoroforilor în diferite tipuri de alimente, care sunt un amestec complex de fluorofori, inclusiv proteine (aminoacizii aromatici triptofan, tirozină și fenilalanină), cofactori (NADH, FADH și FMN), vitamine (piridoxină, vitamina A, tocoferol și riboflavină), clorofilă și porfirine. În plus, în timpul procesării și depozitării, produsele de reacție Millard și oxidarea lipidelor produc substanțele chimice responsabile de fluorescență[8]. Acești fluorofori au emisie de fluorescență în regiunea specifică a spectrelor prezentate în figura I.2.

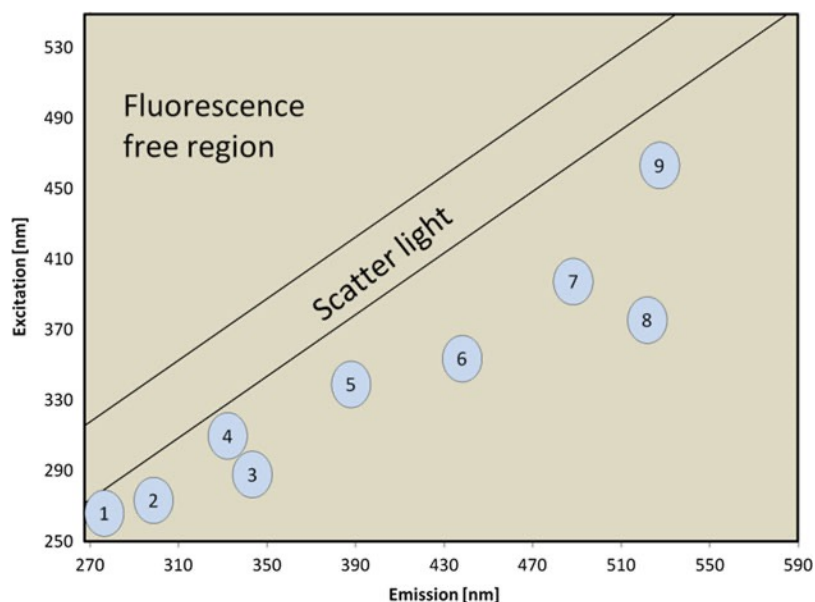


Figura I.2 Diagramă de contur pentru spectrul de fluorescență 2D pentru a arăta diferiți fluorofori: fenilalanină (1), tyrosine (2), tryptophan (3), vitamina E (4), pyridoxine și derivatele acestora(5 and 7), NADH (6), FMN, FAD, și riboflavin (8 and 9)[9]

I.2. Metode folosite în spectroscopia de fluorescență

Tehnica traditionala (RA) este utilizată de obicei pentru examinarea probelor diluate și clare, pentru care absorbanta probei nu depășește 0,5. În acest caz fasciculul incident cade perpendicular pe peretele cuvei, iar emisia de fluorescență se determină la 90 de grade față de fasciculul incident. Intensitatea emisieii de fluorescență este proporțională cu concentrația de fluorofori, conform ecuației (1):

$$F = 2.303KI_0\epsilon bc \quad (1)$$

unde K este o constanta bazata pe geometria instrumentului, I_0 este intensitatea fasciculului de excitatie, ϵ este absorbativitatea molară a fluoroforului analizat, b este lungimea drumului parcurs de lumina prin cuva, iar c este concentratia.

Daca absorbanta probei este mai mare de 0,5, pentru determinarea intensitatii reale a emisieii de fluorescanta trebuie facute anumite corectii, deoarece pe fiecare strat din proba ajunge o intensitate diferita a luminii incidente, deoarece straturile anterioare absorb o parte din fasciculul excitator. În plus, poate sa apara și fenomenul de re-absorbție a luminii emise prin fluorescanta, mai ales daca deplasarea Stokes este mică. Astfel, intensitatea reală a emisieii de fluorescență este influențată de absorbția la ambele lungimi de undă (λ_{exc} ; λ_{em}), conform ecuației (2):

$$E_m(\lambda_{exc}; \lambda_{em}) = KF(\lambda_{exc}; \lambda_{em})10^{-(ABS(\lambda_{exc})+ABS(\lambda_{em}))b} \quad (2)$$

În această ecuație, $E_m(I_{exc}, I_{em})$ este intensitatea reală a emisiei de fluorescență, $F(I_{exc}, I_{em})$ este intensitatea de fluorescență măsurată pentru a absorbanța scăzută (deci pentru proba diluată),

I_{exc} este lungimea de undă cu care a fost excitată proba, I_{em} este lungimea de undă a fasciculului emis prin fluorescență, $ABS(I_{exc})$ reprezintă absorbanta probei la lungimea de undă de excitație, $ABS(I_{em})$ reprezintă absorbanta probei la lungimea de undă de emisie, K este o constantă de normalizare, iar b este lungimea drumului parcurs de lumina prin cuva. Factorul $10^{-(ABS(\lambda_{exc})+ABS(\lambda_{em}))b}$ se numește factor de corecție al absorbantei [10]

Prin urmare, în tehnica RA trebuie diluată proba originală cu un solvent adecvat până când se atinge o absorbantă mai mică de 0,5. Uneori, rezultatele obținute din probe diluate nu sunt neapărat echivalente cu cele obținute din proba originală. Acest lucru se datorează pierderii mediului original din matricea netratată, ceea ce este semnificativ, având în vedere că substanțele chimice fluorescente sunt foarte sensibile la mediul înconjurător [11]. Pentru soluționarea problemei și pentru a evalua direct probele native (care pot fi concentrate, tulburi sau chiar solide), este preferabilă tehnica frontală cunoscută și sub numele de "front-face spectroscopy". Tehnică utilizată pentru prima dată în 1968 [12]. Principala variație față de abordarea tradițională este schimbarea unghiului de incidență, după cum se poate observa și în figura I.3. Acest unghi este definit ca fiind unghiul creat de fasciculul de excitație și perpendicularul la suprafața luminată a celulei și este, de obicei, de aproximativ 30° în tehnica "front-face". Emisia se măsoară la 90° de grade în raport cu fasciculul de excitație. Astfel, proba este excitată și radiația emisă este măsurată pe aceeași față a celulei (în prezent se folosesc cuve triunghiulare). Ca urmare, radiația nu trece prin toată soluția. În această metodă, lumina reflectată, radiația împrăștiată și procesele de depolarizare sunt reduse [13].

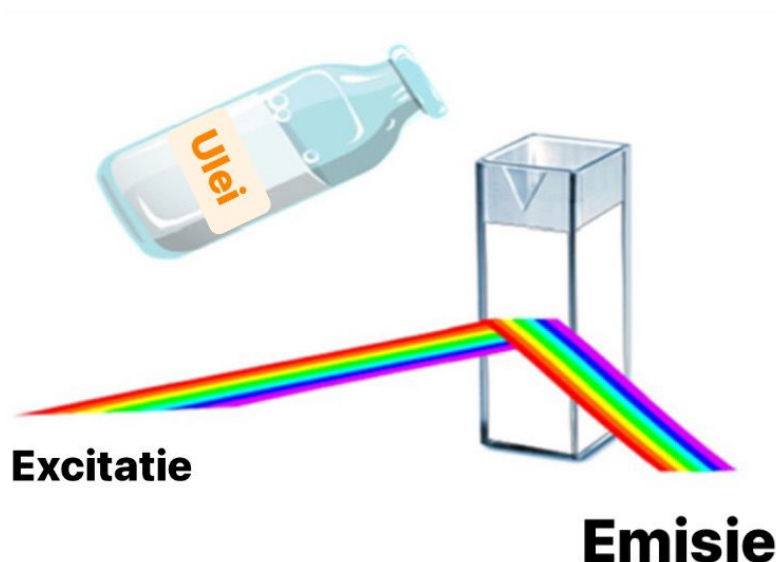


Figura I.3 Schematizarea metodei spectroscopice de fluorescență "front-face"

Pentru a verifica modul în care măsurătorile fluorimetrice sunt afectate de proprietățile intrinseci ale unor fluorofori, Zandomenighi et al. au realizat măsurători ale emisie de fluorescență pentru doi fluorofori "test" a căror spectre de fluorescență acoperă domeniul spectral de fluorescență al uleiului de măsline, și anume: vitamina E (absoarbe la 250-310 nm ; emite la 300-450 nm) și Riboflavina (absoarbe la ~500 nm; emite la 500-700 nm). Astfel ei au folosit atât tehnica RA (probe diluate) cât și cu tehnica FF (probe concentrate), și au ajuns la concluzia că, spectrele de fluorescență pentru probe ce aveau absorbanta mare (până la 10 a.u.) obținute cu tehnica FF, sunt foarte similare cu cele "ideale" măsurate cu tehnica RA pentru o absorbanta sub 0,5 a.u. În plus, s-a observat că intensitatea maximului de fluorescență depinde exponențial de concentrația fluoroforului. În plus, autorii concluzionează că în prezența a doi sau mai mulți fluorofori (cum e cazul uleiului de măsline), între intensitatea emisie de fluorescență și concentrația de fluorofori, va exista o dependență liniară numai la acele lungimi de undă la care absorbanta corespunzătoare a tuturor fluoroforilor este scăzută. În cazul în care absorbanta corespunzătoare unor fluorofori este mai mare, se va observa un spectru deformat, iar intensitatea emisie de fluorescență nu mai depinde de concentrația fluoroforului[10].

Cu toate acestea, epifluorescența, de altfel și modulul utilizat în studiul de față, este recomandată pentru analiza uleiurilor datorită capacității sale de a detecta și cuantifica fluoroforii naturali, cum ar fi polifenolidele și clorofila, care indică autenticitatea și calitatea produsului. Acest mod prezintă, de asemenea, o sensibilitate și o specificitate ridicată, permițând identificarea precisă a compușilor. Avantajul și deosebirea de metoda clasică fiind reducerea cantității analizate, fiind nevoie de un volum considerabil mai mic. În plus, epifluorescența păstrează integritatea uleiului,

permițând efectuarea, în cazurile necesare, de analize suplimentare. Viteza și eficiența acestei metode permit testarea unui număr mare de probe într-o perioadă scurtă de timp, ceea ce este esențial pentru controlul calității în producția și comercializarea uleiului de măsline[14].

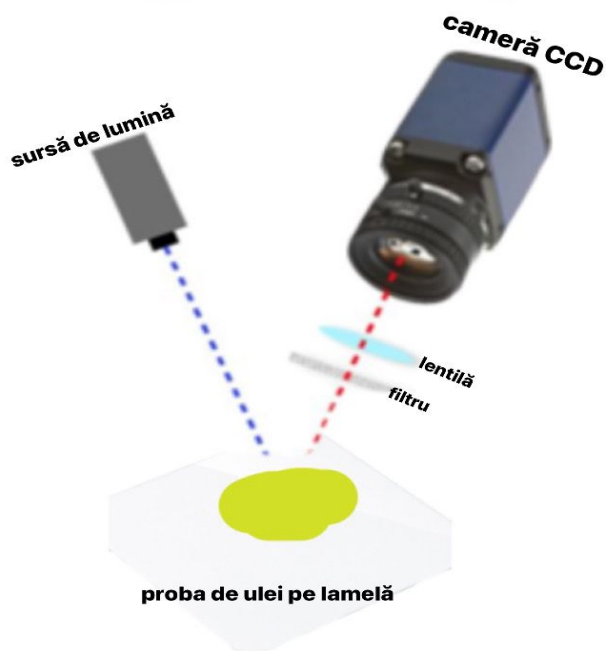


Figura I.4 Ilustrarea principiului de epi-iluminare

În figura I.4 este reprezentat schematic modulul de epi-iluminare. Iluminarea și captarea luminii emise ale uleiului se realizează din partea datorită amplasării pe aceeași parte a sursei de lumină și a detectorului.

1.3. Uleiul de măsline

Cu o datare din timpurile biblice, producția și utilizarea uleiului de măsline (OO- olive oil) a cunoscut o extindere dincolo de regiunea aparținătoare Mării Negre și în alte părți ale lumii [15]. Faima sa cunoscând încă din Grecia Antică o popularitate imensă, fiind numit și: "elixir al tinereții și al sănătății", datorită caracteristicilor sale dietetice și a avantajelor pe care le are pentru sănătate [16]. Această grăsime vegetală lichidă, procurată printr-o extracție din fructele de măslin (*Olea europaea* L.) a avut implementări atât pe plan nutrițional, cosmetic cât și farmaceutic [17]. O evaluare din 2017 a patru studii de cohortă și 29 de studii de control randomizate a descoperit că persoanele cu cel mai mare aport de ulei de măsline au avut o probabilitate cu 16% mai mică de a dobândi diabet de tip 2 decât cele cu cel mai mic aport. Mai mult, analiza a descoperit că

suplimentarea cu ulei de măsline a îmbunătățit markerii de control al glicemiei pe termen lung și glicemia la post la persoanele cu diabet de tip 2, în comparație cu grupurile de control, ceea ce implică faptul că uleiul de măsline poate fi eficient în prevenirea diabetului de tip 2 și în îmbunătățirea rezultatelor de sănătate al celor care îl au deja[18]. S-a constatat astfel că uleiul de măsline are un conținut ridicat de MUFA (monosaturated fatty acids), în special de acidul oleic, care reprezintă 55-83% din compoziția acizilor grași[19], care îmbunătățesc metabolismul glucozei și cresc oxidarea grăsimilor postprandiale și termogeneza indusă de dietă în comparație cu dietele mai bogate în grăsimi saturate[16]. Cu toate acestea, studiile au continuat arătându-se că pe lângă conținutul ridicat de acid oleic, OO conține numeroși compuși minori, dar foarte bioactivi [20], care, deși sunt prezenți doar în proporție de 1-2% din greutatea uleiului, includ peste 230 de compuși chimici [21] (inclusiv tocoferoli, squalene, alcoolii grași, alcoolii triterpenici, steroli vegetali, pigmenți polari și compuși hidrofili, în principal polifenoli, cum ar fi oleuropeina și metaboliții săi hidroxitirozol și tirozol, care constituie aproximativ 80% din conținutul fenolic al uleiului de măsline [22]. Compușii fenolici se regăsesc mai ales în uleiul de măsline virgin (VOO) și extravirgin (EVOO) atunci când sucul de măsline este colectat în întregime prin presarea mecanică a măslinelor. Numeroși compuși, în special polifenoli, se pierd în procesul de rafinare utilizat pentru producerea uleiului de măsline obișnuit sau rafinat [23].

Consumul sub formă de suc de fructe, cunoscut sub numele de ulei de măsline virgin (VOO), a devenit unul dintre componentele cheie ale dietei mediteraneene datorită efectelor benefice pentru sănătate: împotriva bolilor cardiovasculare și a cancerului [24]. Producția mondială de ulei de măsline a fost aproximată ca fiind de 3×10^6 t pe an, Spania fiind principalul producător, cu o producție medie de $1,4 \times 10^6$ t în ultimele trei sezoane. Creșterea semnificativă a cererii de ulei de măsline de înaltă calitate din ultimii ani datorându-se de altfel și caracteristicilor sale senzoriale unice [25]

În cadrul studiului PREDIMED (Prevention with Mediterranean Diet), uleiul de măsline extravirgin (EVOO) a îmbunătățit tensiunea arterială, controlul glicemiei la diabetici, funcția endotelială, stresul oxidativ și profilurile lipidice (scăderea TAG, creșterea HDL și scăderea colesterolului total și LDL) și a redus concentrațiile de markeri inflamatori, cum ar fi proteina C reactivă și IL-6[26]. Remarcându-se și pentru ajutorul său într-o mai bună favorizare a colesterolului bun (HDL) și scăderea colesterolului rău (LDL)[27].

1.4. Studii de fluorescență asupra uleiului de măsline

O diversitate de studii datate încă din secolul XX au arătat ca uleiul de măsline extravirgin înglobează o varietate bogată de antioxidanți, printre care se numără carotenoizii și compușii fenolici, cu proprietăți lipofile și hidrofile, prezenți în multe alte fructe și legume. În categoria antioxidantilor lipofili se includ tocoferolii, în timp ce cei hidrofili includ flavonoidele, alcoolii și acizii fenolici, secoiridoidele (prezente exclusiv în plantele din familia Olearaceae) și metabolitii acestora [28]. Cu toate acestea, efectele anticancerigene ale carotenoizilor ((în special β – carotenoizi), prezența acizilor fenolici simpli ca acizi secundari [29] și a acizilor galici (substanță prezentă și în ceai) [30] au reprezentat un interes deosebit în domeniu, existând un număr mare de articole raportate. Printre care cercetarea scrisă de Van Poppel et al. [31] din 1997, în care a fost explicată activitatea anticancerigenă a carotenoizilor. Cercetarea a fost folosită drept bază pentru articolul publicat 17 ani mai târziu, în 2012, de McQuistan Tj et al. [32], unde s-a demonstrat că aceste concentrații de clorofilă întâlnite în legumele verzi (legume bogate în clorofilă) pot oferi o chimioprotecție semnificativă împotriva cancerului prin reducerea biodisponibilității substanțelor cancerigene. În cazul uleiului, precum cel de măsline, culoarea a fost un prim indice care a dovedit prezența clorofilei și carotenoizilor, cu toate acestea, metodele utilizate până în 2012 nu au putut oferi informații precise și rapide în privința cantității totale prezente în uleiul de măsline a acestora (carotenoizilor și clorofilei) [33].

Componenta esențială a procesului de producție și comercializare a uleiului de măsline este reprezentată de ramura industriei. În timpul procesului de măcinare a măslinelor, caracterizarea rapidă a uleiului rezultat din aceste fructe este necesară pentru separarea diferitelor produse din depozite pe baza proprietăților lor, asigurând astfel identitatea, calitatea și trasabilitatea. Cu ajutorul abordărilor actuale, controalele riguroase ale calității nu pot fi realizate în mod satisfăcător în prezent din cauza necesității unor instrumente analitice care să furnizeze informațiile relevante cât mai rapid și în continuu. De aceea, procedurile nedistructive sunt căutate și utilizate ca o alternativă în vederea îmbunătățirii, fiind necesară dezvoltarea și confirmarea acestora. Pornind de la acest impediment, Sikorska et al. [34] a raportat tehnicile fluorescenței suficient de abile în monitorizarea compușilor din ulei. După acest studiu, aplicarea fluorescenței în analiza alimentelor a cunoscut o creștere a utilizării, considerabilă, în ultimii ani devenind din ce în ce mai populară [35]. Uleiurile vegetale, în special uleiul de măsline, reprezentând una dintre categoriile importante pentru care această tehnică neinvazivă a fost suficient de fiabilă, reușind să confere o analiză precisă [27]. Tehnica fluorescenței în unghi drept a reprezentat o primă alegere în vederea studierii datorită luminii de excitație ajunsă la detector, redusă la minim. Cu toate că zgomotul de

fond s-a dovedit a fi redus, implicând permițând o măsurare mai precisă a semnalului de fluorescență, metoda nu a conferit rezultatele corecte pentru probele nediluate cu densități optice mari, precum uleiurile vegetale. În lucrarea lui Maurizio Zandomenighi et al.[10] s-a făcut pentru prima oară o comparație directă între metoda fluorescenței în unghi drept („right-angle”) și fluorescența front-face.

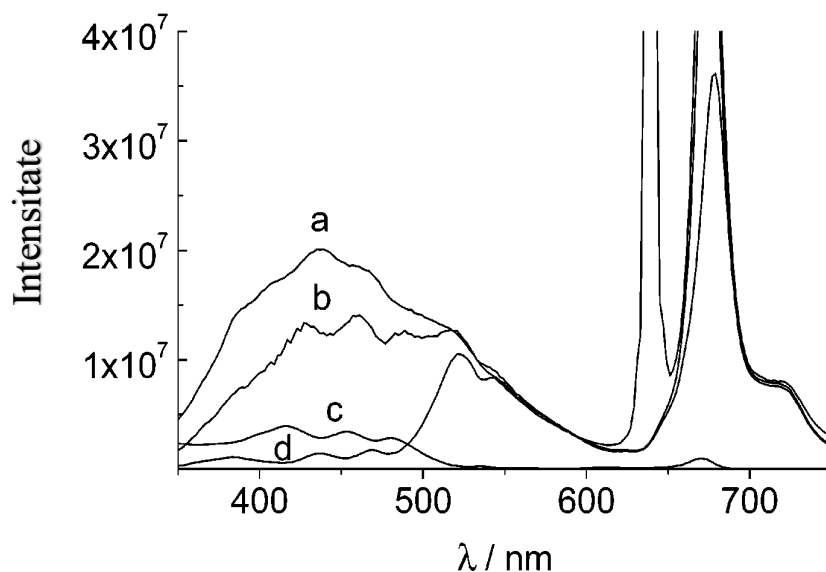


Figura I.5 Spectrul de emisie a uleiului de măsline cu lungimea de undă de excitare de 320 nm. Unde „a” reprezintă spectrul realizat cu metoda front-face; „b”- spectrul rezultat în urma utilizării metodei în unghi drept cu aplicarea unei corecții de absorbție; „c”-spectrul de absorbție a uleiului analizat, multiplicat cu 10^6 ; „d”- spectrul de absorbție a metodei în unghi drept, fără aplicarea unei corecții de absorbție[10]

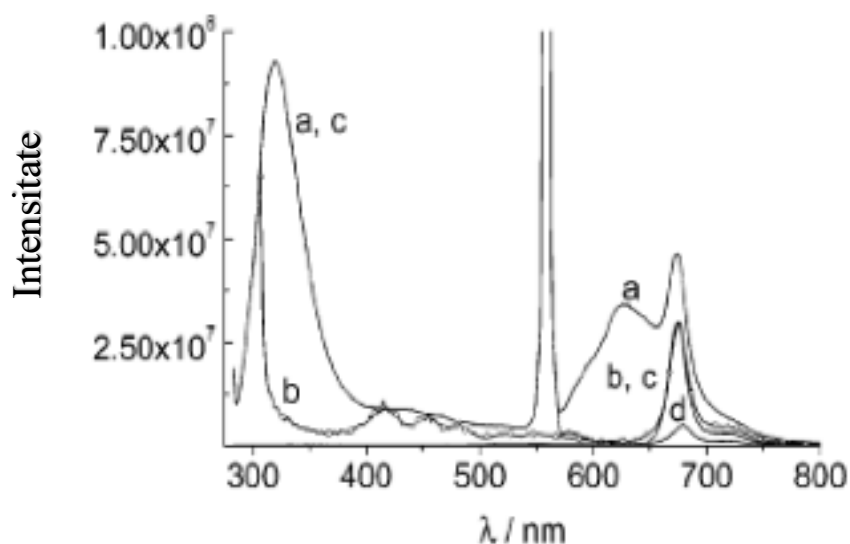


Figura I.6 Spectrul de emisie a uleiului de măsline cu lungimea de undă de excitare de 280 nm. Unde „a” reprezintă spectrul realizat cu metoda front-face; „b”- spectrul rezultat în urma utilizării metodei în unghi drept cu aplicarea unei corecții de absorbție 3.7; „c”-spectrul rezultat în urma utilizării metodei front-face a uleiului analizat, cu o corecție de grad doi; „d”- spectrul rezultat în urma metodei în unghi drept [10].

În cele două figuri, prezentate mai sus (Figura I.5 și Figura I.6), sunt ilustrate rezultatele obținute în cadrul studiului menționat anterior (Maurizio Zandomeneghi et al.[10]), a aceluiași ulei de măsline, nediluat la două lungimi de undă diferite, 320 nm respectiv 280 nm. Spectrele înregistrate cu ajutorul metodei în unghi-drept au fost afectate vizibil din cauza efectului de "Filtru intern", ce apare în cazul soluțiilor prea concentrate. Diferențele semnificative în privința poziției benzilor, numărului, formei și intensității nu au fost prezente în cazul regiunii clorofilei cu o lungime de undă mare. Cu toate că efectul de "filtru intern", produse de absorbția radiațiilor de emisie și excitație, au avut corecții matematice, spectrele de fluorescență în unghi drept au suferit distorsionări semnificative. Contrar, autoabsorbția s-a dovedit că a afectat mai puțin spectrele de fluorescență obținute cu metoda front-face, ducând astfel la obținerea unor informații mai fiabile despre tipul și concentrația fluoroforilor[10].

Cât despre recunoașterea surselor individuale de emisie și atribuirea fiecărei benzi de emisie unui anumit compus, s-a realizat o comparație cu componentele chimice fluorescente pure.

Tabelul I.2 Componentele principale ale uleiului de măsline și proprietățile de fluorescență[36]

Compus	Solvent	λ_{abs} [nm]	Solvent 2	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
Vitamina E					
α -tocoferol	Etanol	292	n-hexan	295	320
β -tocoferol	Etanol	296	n-hexan	297	322
δ -tocoferol	Etanol	298	n-hexan	297	322
γ -tocoferol	Etanol	298	n-hexan	297	322
α -tocotrienoli	Etanol	292	n-hexan	290	323
β -tocotrienoli	Etanol	292	n-hexan	290	323
δ -tocotrienol	Etanol	297	n-hexan	292	324
γ -tocotrienol	Etanol	297	n-hexan	290	324
Clorofilă					
Clorofilă a	Acetonă	430	Eter	436	668
		663	acetonă	405	669
Clorofilă b	Acetonă	455	Eter	436	648
		646	9:1 acetonă/apă	405	652
Feofitina a	Acetonă	409	Eter-acetonă	436	673
		666	9:1 acetonă/apă	406	671
Feofitina b	Acetonă	434	Eter-acetonă	436	661
		654	9:1 acetonă/apă	435	658
Feoborbida a	Acetonă	409	Eter-acetonă	-	-
		667	9:1 acetonă/apă	-	-
Compuși fenolici					
Oleuropeină	Etanol	282	Etanol/n-hexan	270	310
Acid vanilic	-	-	Metanol	270	349

λ_{abs} -lungimea de undă de absorbție; λ_{ex} -lungimea de undă de emisie; λ_{em} -lungimea de undă de emisie

Tabelul I.2 rezumă proprietățile de fluorescență ale substanțelor chimice descoperite în uleiuri sau suspectate de a cauza o emisie a acestora. Banda de lungime de undă scurtă a întregului spectru de fluorescență, ce cuprinde intervalele de 270-330 nm în excitație și 295-360 nm în emisie, corespunde benzii de la 280-310 nm și este atribuită tocoferolilor și fenolilor. Această descoperire a fost susținută de observații suplimentare. Pentru început, s-a stabilit că o bandă similară există în numeroase uleiuri vegetale, fie că sunt presate, rafinate sau nu[34]. Această observație arată că tocoferolii contribuie, de asemenea, la emisia observată în această zonă de lungime de undă, 280-310 nm. Aceștia (tocoferolii) sunt prezenți în majoritatea uleiurilor vegetale la concentrații extrem de variabile, variind între 70 și 1900 mg/kg[37]. Grupa vitaminei E este formată din patru tocoferoli naturali și patru tocotrienoli, toți cu configurația R la cele trei duble conexiuni din lanțul

lateral al tocotrienolilor. Datorită asemănărilor structurale, toți acești compuși au un spectru de absorbție UV și proprietăți de fluorescență foarte asemănătoare (a se vedea Tabelul I.2). α -tocoferolul este cel mai răspândit tocoferol din uleiurile de măsline. Spectrele uleiului de măsline prezintă o bandă identică cu spectrul de luminescență totală a α -tocoferolului dizolvat în n-hexan. Spectrele de excitație corespund bine cu spectrele de absorbție ale tocoferolului în n-hexan[36]. Cu toate acestea, o cercetare mai amănunțită a spectrelor relevă contribuții din partea mai multor fluorofori suplimentari. Cât despre spectrul vitaminei E dizolvat în n-hexan se poate afirma că în urma analizei spectrale a emis, similar benzii existente în uleiul de măsline, în jurul valorii de 320 nm. Majoritatea polifenolilor prezenți în ulei sunt compuși fluorescenți care absorb în intervalul 260-310 nm și emit în intervalul UV apropiat, cu benzi centrate la 310-370 nm[38]. Acești compuși fenolici pot fi identificați prin fluorescență după separarea HPLC la lungimi de undă de excitație la 264 nm, 280 nm, 310 nm, și emisie de 320 nm, 354 nm, 430 nm[39]. Cheikhousman et al. [40] au studiat spectrele de fluorescență ale unui standard de vitamina E în hexan și ale unui extract de polifenoli din ulei în metanol-apă la aceeași concentrație ca și cea a uleiului de măsline extravirgin. Maximele în spectrele de excitație ale fluorescenței măsurate la lungimea de undă de emisie de 330 nm a extractului de polifenol din ulei și a vitaminei E au fost de 284 nm respectiv 290 nm. Asemănarea dintre spectrul reconstruit al amestecului și spectrul uleiului de măsline extravirgin a evidențiat contribuția spectrală atât a tocoferolilor, cât și a substanțelor chimice fenolice la fluorescența acestuia[40]. Recent, intensitatea fluorescenței la 280nm excitație și 320 nm în e emisie a fost utilizată cu succes pentru a evalua concentrația de fenol în extractele de metanol și apă a uleiului de măsline[41]. Datorită proprietăților de fluorescență comparabile dintre tocoferoli și alți compuși fenolici(Tabelul I.2), emisia acestora apare ca o singură bandă largă. Dacă se dorește identificarea diferitelor specii, se va recurge la o investigație mai amănunțită a spectrelor de excitație și de emisie în regiunea respectivă.

În Figura I.6 s-a observat concordanța dintre spectrele de emisie și excitație ale uleiului de măsline cu cele ale tocoferolului.

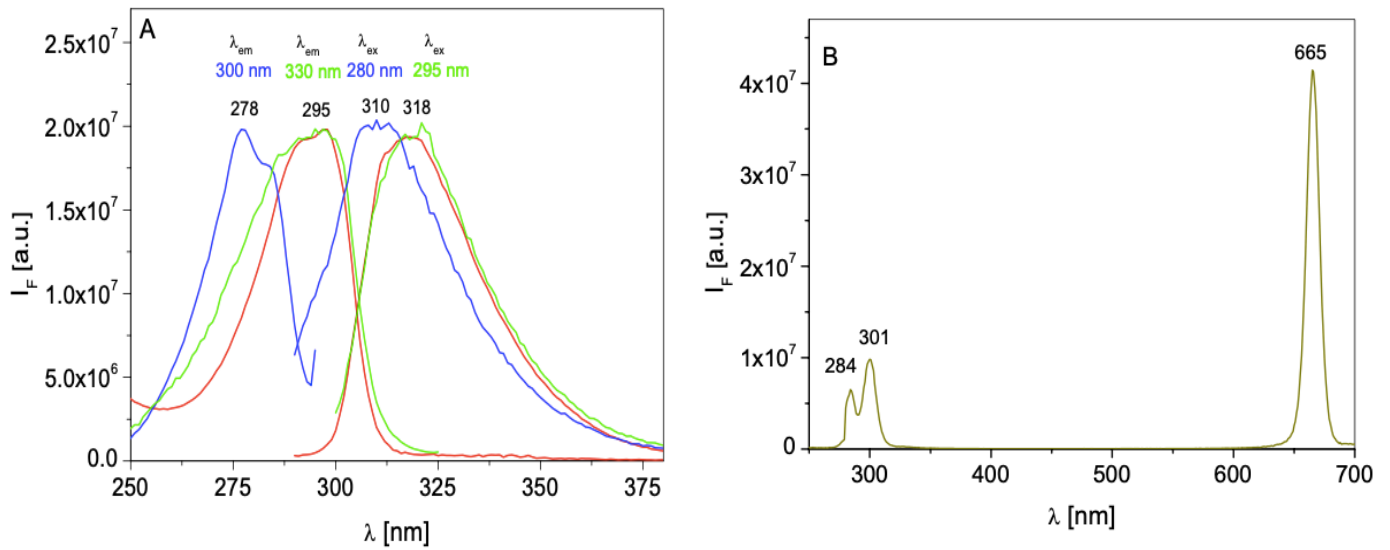


Figura I.6 A: spectrele fluorescența (de emisie și de excitație) ale uleiului extra virgin de măsline (verde și albastru) și a tocoferolului (roșu), rezultate în urma excitării la lungimile de undă de 280 nm și 295 nm. B: spectrul de fluorescența sincron a uleiului extra virgin de măsline[36].

Pentru evitarea suprapunerii benzilor spectrale s-a recurs la metoda de fluorescență sincronă (fluorescența front-face), reducându-se lățimile spectrale ale acestor benzi. Ulterior, a fost descoperită și o asocieră liniară între intensitatea emisie de fluorescența la 301 nm și concentrația totală de tocoferol, evaluată cromatografic pentru o serie de uleiuri vegetale diluate diferit .[34]

Capitolul II: Materiale și metode

II.1 Materiale

Pentru realizarea studiului s-au achiziționat, din comerț, cinci tipuri distincte de ulei vegetal: extra-virgin de măsline de origine italiană, extra-virgin nativ din Spania, extra-virgin organic spaniol, de floarea-soarelui (SFO-sunflower oil) produs în România și din turte de măsline (OPO-olive pomace oil) importat din Germania, evidențiate în Tabelul II.1.






Pentru a preveni contaminarea compoziției uleiului cu compușii nesănătoși din plasticul ambalajelor (polietilen tereftalat, polistiren, polipropilenă etc.), eșantioanele au fost depozitate în flacoane din sticlă opacă cu o capacitate de 30 ml. Recipientele originale se pot observa în Figura II.1. Depozitarea a avut loc într-o cameră ferită de radiația solară directă, la temperaturi de 15-20 de grade Celsius.



Figura II.1 Probele de ulei în recipientele originale

În tabelul II.1 sunt prezentate diverse informații legate de uleiul utilizat pentru analiza spectroscopică. Astfel, pe lângă țara de origine și denumirea comercială, este indicată prescurtarea folosită pentru fiecare tip de ulei în această lucrare precum și compoziția în acizi grași (în g/L)

Tabel II.1. Prezentarea probelor de ulei utilizate

Nr. crt.	Denumire probă	Țară de origine	Prescurtare- nume probă	Compoziție acizi grași /litru [g/L]	Recipient de depozitare
1	Ulei de măsline extra-virgin organic	Spania	EVOO-1	14	
2	Ulei de măsline extra virgin	Italia	EVOO-2	14	
3	Ulei de măsline extra-virgin	Spania	EVOO-3	12,7	
4	Ulei de floarea sorelui	România	SFO-4	10	
5	Ulei din turte de măsline	Germania	OPO-5	13,7	

II.2 Metode

Pentru a preveni interferența solvenților în fluorescența uleiurilor[36], acestea au fost utilizate în forma lor originală. Maximele de absorbție au fost determinate cu un spectrofotometru cu dublu fascicul tip UV-VIS (V-750 Jasco, produs în Japonia). Fiecare probă, în volum de 350 μ l, a fost prelevată cu o pipetă cu volum reglabil, iar apa distilată a fost folosită ca soluție de referință. Rezultatele obținute anterior au fost stocate și utilizate pentru excitarea și determinarea spectrelor de fluorescență și epi-fluorescență, cu ajutorul unui Spectrometru de fluorescență StellarNet Inc. respectiv un Spectrofluorimetru FP8000 (Jasco, Japonia) setat la parametri optimi pentru studiul de față. Rezultatele măsurătorilor au fost prelucrate în software-ul Origin (produs de OriginLab Corporation).

Capitolul III: Rezultate și discuții

Sub acțiunea unui fascicul provenit de la un LED ce emite lumina cu lungime de undă de 365 nm, s-au observat, vizual, emisia de fluorescență a unuia dintre uleiurile de măsline extra-virgin analizate (EVOO-3) și a unei probe de ulei de floarea-soarelui. După cum se poate observa în Figura III.1 A, emisia de fluorescență a uleiului de măsline extravirgin este evidentă (fasciculul observat are culoarea portocalie, chiar dacă fasciculul excitator este indigo).

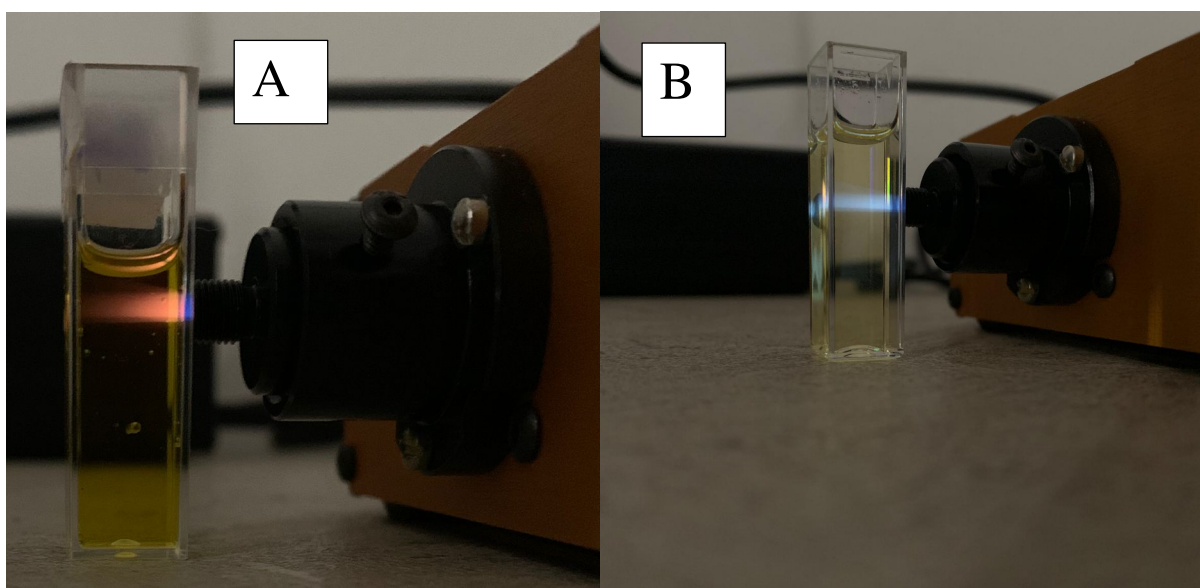


Figura III.1 A: Fluorescența uleiului de măsline; B: Fluorescența uleiului de floarea-soarelui; excitare la 365 nm

În Figura III.1 s-au observat diferențe vizibile între fluorescența fiecărui tip de ulei. În imaginea A, uleiul de măsline extravirgin prezentând o emisie de intensitate mare, de culoare portocalie, contrar imaginii B unde fluorescența a fost aproape inexistentă, observându-se o emisie slabă de culoare albastră. Am concluzionat posibilitatea utilizării metodei de fluorescență pentru diferențierea uleiului de măsline extravirgin de alte tipuri de ulei, în cazul de față, uleiul de floarea-soarelui. De asemenea, prezența unei emisii puternice în uleiul din imaginea A (ulei de măsline extravirgin) poate indica și calitatea și autenticitatea acestuia, deoarece substanțele chimice care cauzează fluorescența sunt legate de caracteristicile antioxidante și nutriționale ale uleiului.

Pentru furnizarea unor informații suplimentare care să susțină teoria de mai sus, am excitat cele două probe de ulei cu o lungime de undă semnificativ mai mare, urmărind evoluția comportamentului semnalului de fluorescență sub intensificarea fasciculului incident, Figura III.2.

S-a remarcat că la 590 nm, uleiul de măsline extravirgin continuă să emită, în continuare, o lumină portocalie dar de această dată mai puternică, sugerând o fluorescență substanțială. Acest lucru implică faptul că substanțele chimice fluorescente prezente în ulei, cum ar fi carotenoidele, sunt, de asemenea, stimulate la această lungime de undă de 590 nm, menținând astfel intensitatea semnalului de fluorescență. Consistența fluorescenței în cazul uleiului din imaginea 1 (Figura III.1 și Figura III.2) a indicat o prezență stabilă a compușilor fluorescenți.

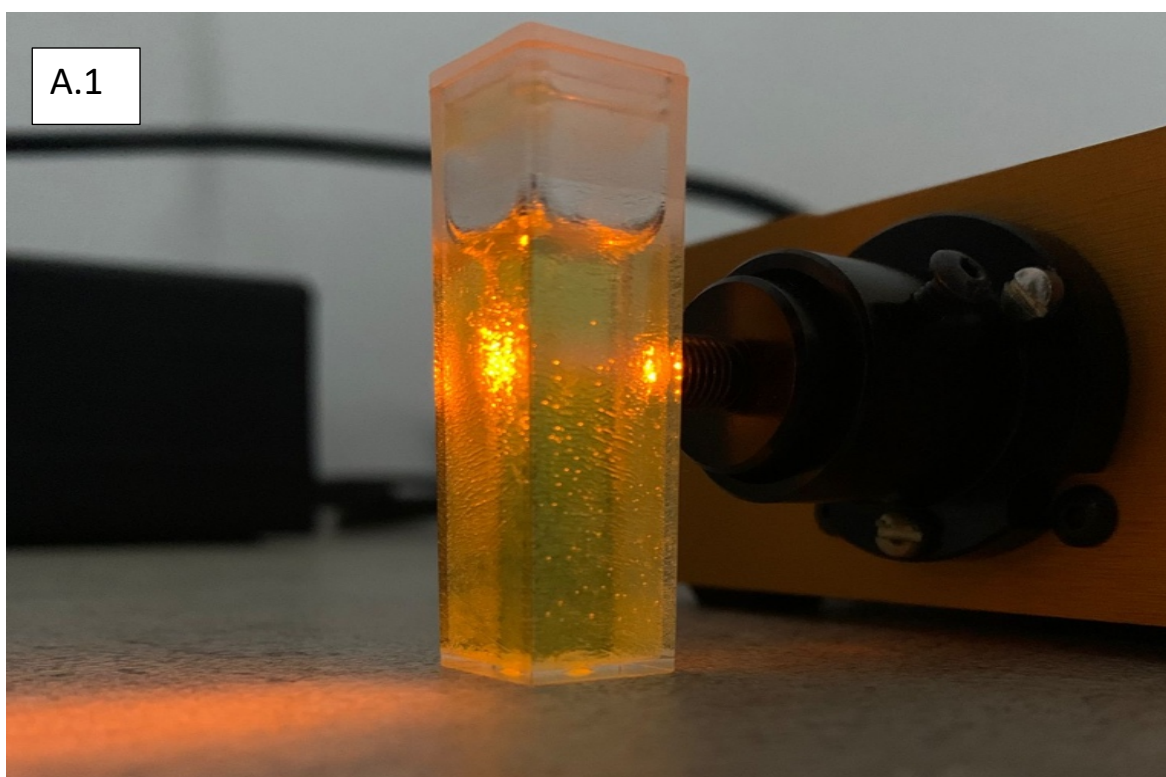


Figura III.2 Fluorescența uleiului de măsline (imaginea A.1) cu o lumină excitatoare de lungime de undă de 590

Așadar, fluorescența clasică la 590 nm a confirmat constatările anterioare, demonstrând că abordarea prin fluorescență este adecvată pentru a distinge uleiul de măsline extravirgin de alte uleiuri, cum ar fi uleiul de floarea-soarelui.

Pe baza ipotezelor rezultate din cele trei figuri menționate mai sus, am aprofundat investigațiile pentru a le valida sau respinge.

A fost necesară aflarea maximelor de absorbție la care să putem furniza informații cât mai concrete despre lungimile de undă necesare excitării uleiurilor pentru determinarea spectrelor de fluorescență, așadar, am realizat măsurători cu ajutorul unui spectrofotometru cu dublu fascicul tip UV-VIS (ultraviolet-vizibil), Figura III.3.

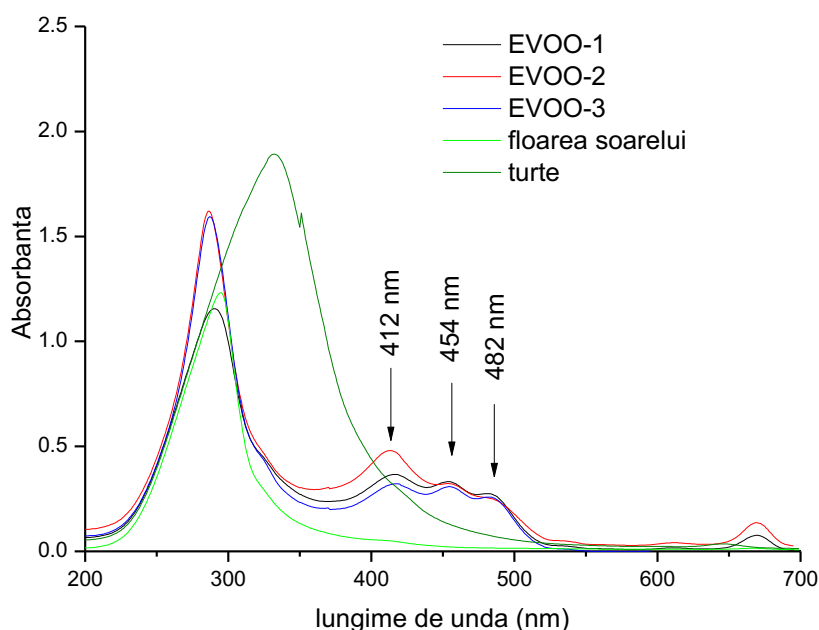


Figura III.3 Spectrele de absorbție UV-VIS

În cazul uleiului de măsline extra-virgin (EVOO-1; EVOO-2; EVOO-3) lungimea de undă de 365 nm nu se suprapune cu benzile de absorbție optime pentru substanțele chimice din uleiurile studiate, rezultând o excitare mai puțin eficientă și, prin urmare, o emisie de fluorescență mai scăzută. Deși compușii chimici ai uleiurilor de măsline pot avea o absorbție minoră la această lungime de undă, puterea lor de emisie este mai mică decât la alte lungimi de undă. Cu toate acestea, am decis să păstrez valoarea de 365 de nm pentru investigații, deși această valoare poate să nu fie cea mai bună lungime de undă pentru excitarea substanțelor chimice cheie din uleiuri, este utilă pentru un studiu aprofundat și comparativ. Aceasta s-ar putea, chiar, dovedi a fi necesară pentru identificarea impurităților, caracterizarea detaliată și validarea metodei analitice. Atunci

când este asociat cu alte lungimi de undă, poate oferi o imagine completă și aprofundată a compoziției și calității uleiurilor studiate.

Acestea fiind spuse, lungimile de unda folosite pentru detectarea emisiei de fluorescență în cadrul studiului de față au fost: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482 nm și 530 nm.

III.1 Investigarea comportamentului fluorescent a uleiurilor extravirgine de măsline

În Figura III.4 sunt prezentate spectrele de epi-fluorescență a primei probe EVOO-1, cu ajutorul unui Spectrofluorimetru FP8000. După cum se poate observa, maximul emisiei de fluorescență este poziționat la 677 nm pentru cazurile excitării cu: 365 nm, 412 nm și 482 nm, și la 670 nm pentru excitarea cu 454 nm. De asemenea se constată o modificare a intensității maximului emisiei de fluorescență: spectrul obținut pentru excitarea la 482 nm are cea mai mare intensitate, Tabelul III.1.

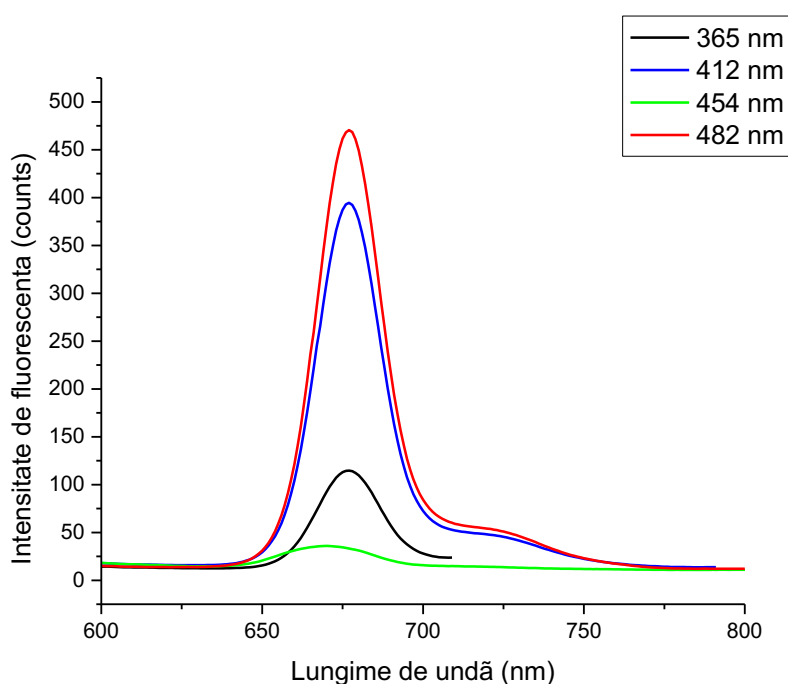


Figura III.4. Spectrele de epi- fluorescență a probei 1 (EVOO) pentru excitarea cu lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482 nm

Tabelul III.1 Schematizarea valorilor intensității fluorescenței în concordanță cu lungimea de undă specifică pentru proba EVOO-3

Lungimea de undă excitatoare (nm)	365	412	454	482
Intensitatea de fluorescență (counts)	114,6	394,5	35,9	470,5

În cazul colectării informațiilor despre emisia de fluorescență a probei EVOO-1, parametrii de achiziție a datelor, parametrii instrumentului utilizat de măsurare (Spectrofluorimetru FP8000), au fost setate: 3X5; sensibilitate înaltă (High). Unde „3” este largimea fantei monocromatorului de excitare (in mm), iar „5” este largimea fantei monocromatorului de emisie (in mm), iar „high” reprezintă un mod de rezoluție înaltă ducând la o maximizare a sensibilității de detecție a semnalului.

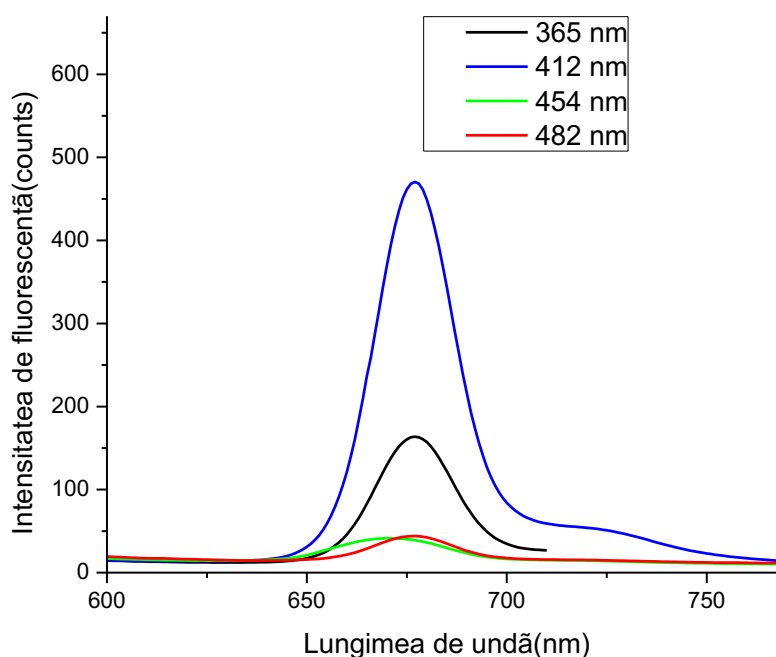


Figura III.5. Emisia de fluorescență (metoda epi-fluorescenței) a probei 2 (EVOO-2) pentru excitarea cu lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482, nm

În cazul probei EVOO-2, am utilizat aceiași parametri de achiziție a datelor: 3X5 rezoluție înaltă (High), In Figura III.5. se observă că spectrul obținut pentru excitarea cu lungimea de undă de 412

nm are intensitate maximă, urmat apoi de 365 nm cu o intensitate considerabil mai mică, după cum se remarcă în Tabelul III.2.

Tabelul III.2 Schematizarea valorilor intensității fluorescenței în concordanță cu lungimea de undă specifică pentru proba EVOO-2

Lungime de undă excitatoare (nm)	365	412	454	482
Intensitate de fluorescență (counts)	469,16	168,2	45,5	44,1

În cazul probei EVOO-3, Figura III.6, compoziția densă a uleiului a eronat datele înregistrate pentru metoda 3X3 rezoluție înaltă (High). Am luat decizia de a face o colectare a datelor uleiului extravirgin de măsline la un interval de 5 secunde, măsurătoare repetată de 5 ori consecutiv pentru a obține o medie a semnalului (5X5). Această metodă a ajutat la reducerea zgomotului și la îmbunătățirea a preciziei măsurătorilor, păstrându-se însă sensibilitatea înaltă a detectării semnalelor fluorescente.

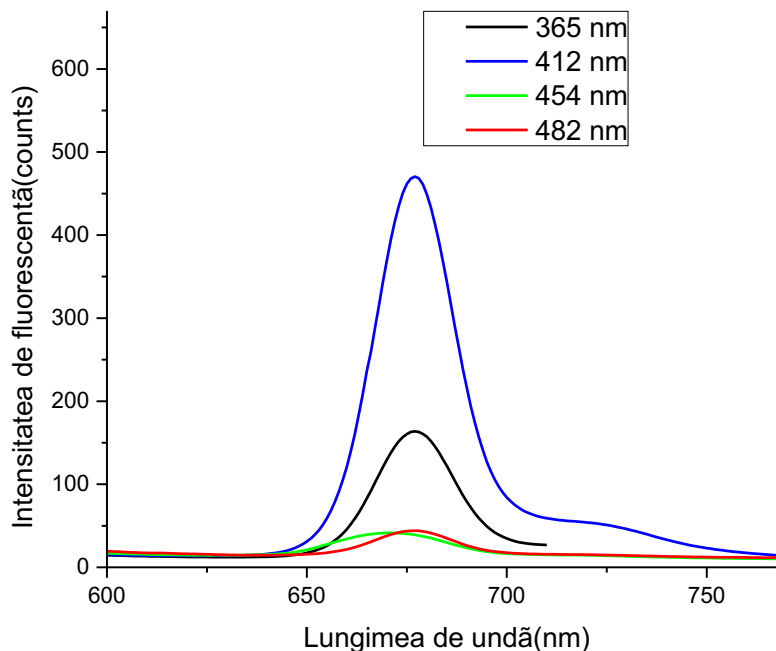


Figura III.6. Emisia de fluorescență (metoda epi-fluorescenței) a probei 3 (EVOO-3) pentru excitarea cu lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482 nm

Tabelul III.3 Schematizarea valorilor intensității fluorescenței în concordanță cu lungimea de undă specifică pentru proba EVOO-3

Lungime de undă excitatoare (nm)	365	412	454	482
Intensitate de fluorescență (counts)	464,4	366,14	32,5	35,9

În Tabelul III.3 s-au structurat schematic intensitățile de fluorescență. În plus față de cele două probe anterioare (EVOO-1 și EVOO-2), am dorit analizarea comportamentului intensității la o lungime de undă excitatoare de 530 de nm pentru observarea comportamentului fluorescent în cazul unei lungimi de undă mai mare decât cele înregistrate cu ajutorul metodei UV-VIS. Cu toate că, după cum se observă în Figura III.6, lungimea de undă emisă se află la 676 nm, indicând prezența clorofilei-a, magnitudinea este poziționată la un nivel curios de înalt, indicând o cantitate detectată la 530 nm (cu valoarea intensității de fluorescență de: 325,1) mai mare decât în cazul EVOO-2 la o excitare cu lungimea de undă de 412 nm.

Dificultatea înregistrării spectrelor de epi-fluorescență în cazul probei 3 (EVOO-3), m-a condus la investigarea comportamentului fluorescent în primul caz de excitație cu lungimea de undă controversată de 365 nm, pentru modul fluorescenței „front-face” clasic, Figura III.7, cu utilizarea unor cuve: două pătrate și una triunghiulară, parametrii fiind mai ușor de vizualizat în Tabelul III.4.

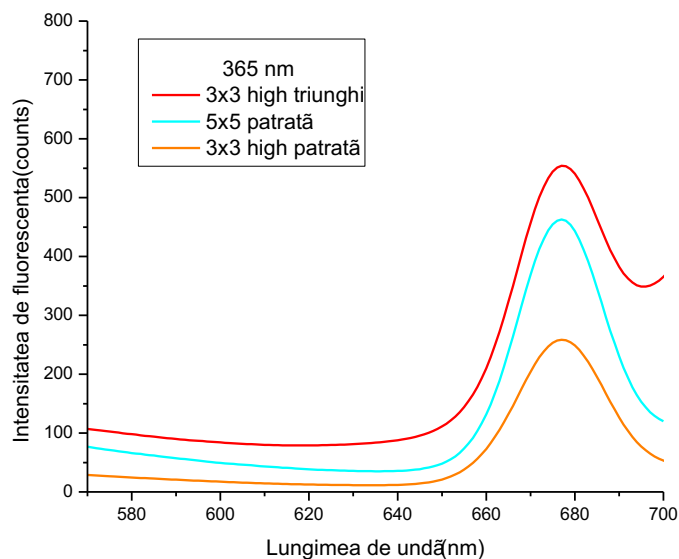


Figura III.7. Emisia de fluorescență (metoda fluorescenței clasice) a probei 3 (EVOO-3) pentru excitarea cu lungimea de undă: 365 nm, utilizând cuve distincte.

Tabel III.4 Parametrii utilizați în modul fluorescenței „fron-face” și cuvele folosite

Parametrii setați aparaturii utilizate	3X3 high	3X5 normal	5x5 normal
Cuva	triunghiulară	pătrată	pătrată

Iar în Tabelul III.5 am structurat maximele în conformitate cu parametrii aleși, concluzionând că sensibilitatea înaltă cu o colectare de 3 ori a câte 3 secunde.

Tabelul III.5 Structurarea maximelor observate în concordanță cu parametrii selectați.

Parametrii setați aparaturii utilizate	Maxime
3X3 sensibilitate înaltă (High)	549,7
3X5 sensibilitate înaltă	252,1
5x5 normal	457,11

Analizând Figura III.7 care prezintă spectrele de fluorescență frontale pentru proba de ulei de măsline (EVOO-3), am observat variații ale intensității fluorescenței pentru diferite setări experimentale (3x3 sensibilitate înaltă (high), cuvă triunghiulară; 5x5 cuvă pătrată și 3x3 cuvă

pătrată și sensibilitatea de detecție ridicată). Spectrul obținut pentru cazul 3x3 sensibilitate înaltă (linia roșie) prezintă cea mai mare intensitate la lungimea de undă de 365 nm, urmat de cazul 5x5 cuvă pătrată (linia albastră) și 3x3 sensibilitate înaltă (linia portocalie). Toate spectrele prezintă un maxim de fluorescență în jurul aceleiași lungimi de undă, ceea ce sugerează că structurile chimice fluorescente sunt detectate în mod similar, indiferent de filtrul utilizat. Consistența maximelor indică măsurători fiabile, iar diferențele de intensitate reflectă sensibilități diferite datorate set-up-ului experimental. În concluzie, proba EVOO-3 prezintă caracteristici tipice pentru uleiul de măsline extravirgin, cu un maxim de fluorescență în jurul lungimii de undă de 365 nm,

Am concluzionat pe baza celor 3 figuri (Figura III.1, Figura III.2, Figura III.3) pentru probele EVOO-1, EVOO-2 și EVOO-3, raportate la studiile de fluorescență următoarele: clorofilele, carotenoidele, polifenolii și vitamina E (tocoferolii) au fost descoperite în timpul analizei fluorescente frontale a probelor de ulei de măsline extravirgin. EVOO-1 prezintă o fluorescență intensă la 365 nm și 412 nm, indicând o cantitate mare de clorofile, cu contribuții importante din partea carotenoidelor și, posibil, a tocoferolilor. EVOO-2 a prezentat un maxim intens la 412 nm, indicând o cantitate mai mare de clorofile specifice acestei lungimi de undă, împreună cu niveluri mai mici de carotenoide și substanțe chimice fenolice. EVOO-3 are caracteristici comparabile cu cele ale EVOO-2, dar cu intensități semnificativ mai mici la 365 nm și 412 nm, indicând o compoziție chimică similară, dar cantități oarecum diferite de clorofile și carotenoide. Aceste deosebiri reflectă variațiile în compoziția chimică și cantitățile de pigmenți și antioxidanți din cele trei uleiuri de măsline extravirgin, care sunt influențate de factori precum originea și procesul de extracție.

III.2 Investigarea comportamentului fluorescent a uleiurilor de floarea-soarelui și turte de măsline

Ulterior, pentru a vedea diferențele dintre spectrele de fluorescență ale uleiului de măsline extravirgin și cele ale altor tipuri de ulei vegetale, am preluat o cantitate mică din uleiul de floarea-soarelui, cărora i-am făcut o expertiză asemănătoare primelor 3 probe analizate anterior.

În cazul uleiului de floarea-soarelui („sun-flower oil”), am identificat, concis Figurii III.8 maximele din spectrul de excitație, ca fiind în jurul valorii de 670-677 nm.

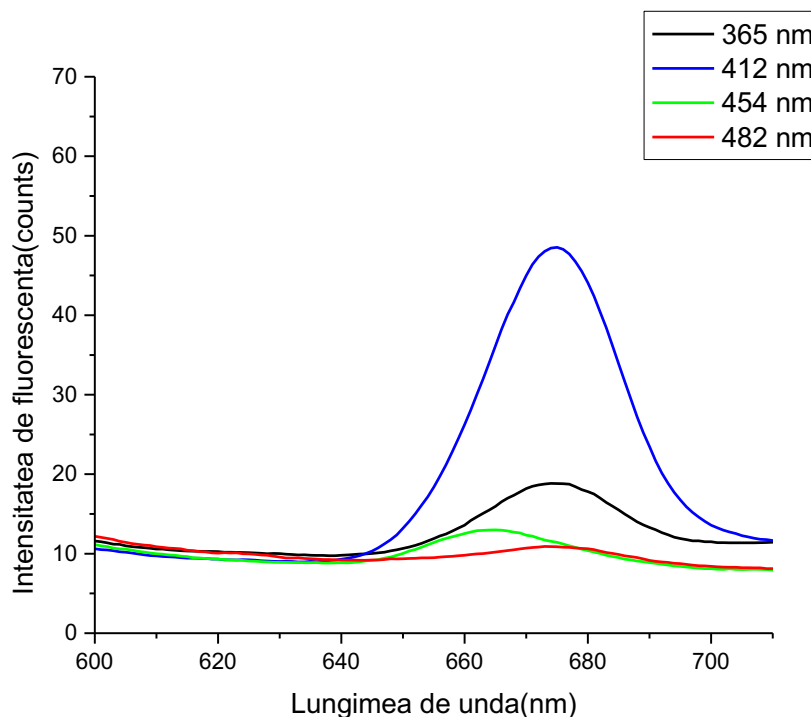


Figura III.8. Emisia de fluorescență (metoda epi-fluorescenței a probei de ulei de floarea-soarelui pentru excitarea cu lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482, nm

Concentrațiile clorofilei-a prezente din uleiul de floarea-soarelui s-au prezentat a fi conform așteptărilor, mai exact: considerabil mai mici comparativ cu probele de ulei de măsline, fapt observabil mai bine în Tabelul III.6.

Tabelul III.6 Schematizarea valorilor intensității fluorescenței în concordanță cu lungimea de undă specifică pentru proba de ulei de floarea-soarelui

Lungime de undă excitatoare (nm)	365	412	454	482
Intensitate de fluorescență (counts)	48,47	19.14	13.1	10.2

Găsind diferențe atât de vizibile numeric între cele două tipuri de ulei: de măsline extra-virgin și de floarea-soarelui, a apărut întrebarea dacă un ulei mai apropiat de cel de măsline ar prezenta diferențe drastice. Răspunsul a venit în urma analizării uleiului de turte de măsline, Figura III.9, unde s-a găsit un singur maxim la lungimea de undă de excitare de 365 nm.

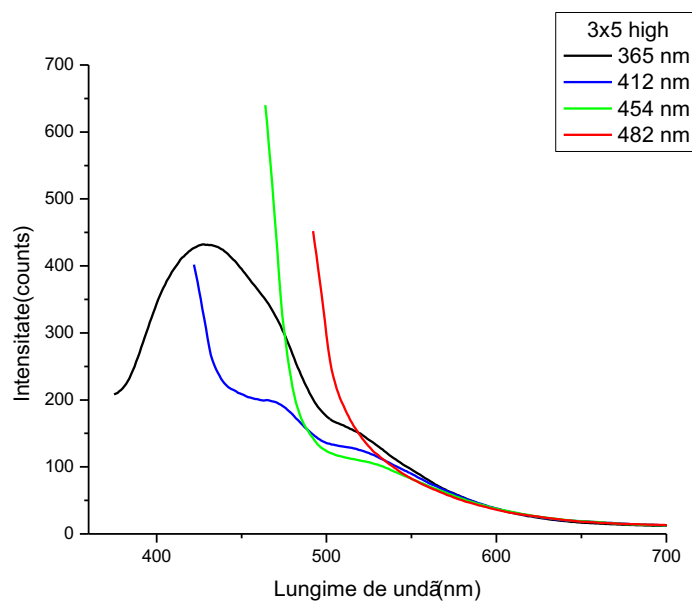


Figura III.9 Emisia de fluorescență (metoda epi-fluorescenței) a probei de ulei de floarea-soarelui pentru excitarea cu lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482 nm

III.3 Concluzionarea datelor înregistrate pentru toate probele

Pentru metoda epi-fluorescenței, maximele din spectrele de fluorescență a probelor EVOO-1, EVOO-2 și EVOO-3, determinate la lungimile de undă: 365 nm, 412 nm, 454 nm, 482 nm, au fost situate la aproximativ 677 nm. Acestea li s-au atribuit, pe baza studiilor menționate în „I.4. Studii de fluorescență asupra uleiului de măsline”, compusul clorofilei: clorofila-a. Proba EVOO-1 a reprezentat o concentrație mare de clorofilă-a în intervalul lungimilor de undă: 412-482 nm, însă, comparativ, EVOO-2 a avut cea mai mare concentrație detectată la 365 nm. În cazul uleiului de floarea soarelui, s-a identificat o prezență a clorofilei-a și clorofila-b de concentrații mici dar concentrații mari de carotenoizi. Diferența neașteptată în cadrul valorilor experimentale a fost reprezentată de uleiul de turte de măsline care a prezentat o emisie curioasă cu un maxim la 440 nm, o intensitate maximă de aproximativ 450 counts. La 412 nm, maximul apare la 460 nm, cu o intensitate de aproximativ 320 counts. Excitația la 454 nm produce cea mai puternică emisie, cu un vârf la 520 nm și o intensitate de aproximativ 650 counts. Excitarea la 482 nm produce un maxim la 530 nm, cu o intensitate de 600 counts. Am observat că maximele se deplasează către lungimi de undă mai mari pe măsură ce crește lungimea de undă de excitație, iar intensitatea

vârfului este cea mai mare la 454 nm, urmată de 482 nm. Pe baza studiilor aferente, am concluzionat că maximul la 440 nm pentru excitare la 365 nm corespunde clorofilei a, în timp ce maximul la 460 nm pentru excitare la 412 nm corespunde clorofilei b. Picul la 520 nm pentru excitare la 454 nm corespunde feofitinei, în timp ce maximul la 530 nm pentru excitare la 482 nm este cel mai probabil atribuit luteinei. Se știe că aceste substanțe chimice se găsesc în uleiurile vegetale, ceea ce contribuie la fluorescența unică observată în acest studiu.

III.3 Compararea spectrelor obținute prin metoda clasică pentru uleiul de floarea-soarelui și EVOO-3

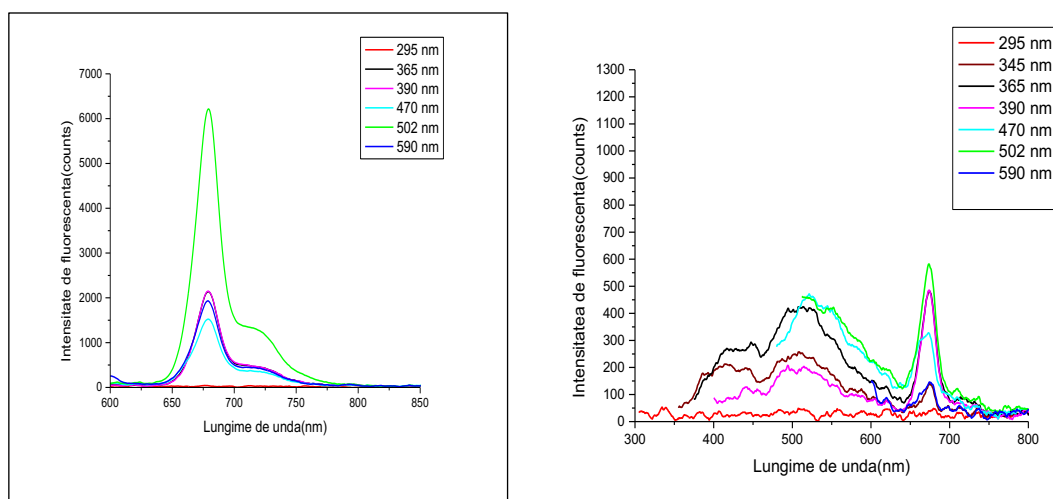


Figura III.7 Spectre de fluorescență. În stânga se află spectrul probei de ulei de măsline extravirgin EVOO-3, pe când în dreapta se află spectrul probei de floarea-soarelui.

În Figura III.7, am dorit o analiză comparativă între comportamentul unuia dintre probele de ulei de măsline extra-virgin cu uleiul de floarea soarelui. Diferențele dintre spectre se resimt în cazul maximelor, în cazul uleiului de masline extravirgin (stânga) intensitățile maximelor de fluorescență sunt mult mai mari decât în cazul uleiului de floarea soarelui (dreapta). Atunci când comparăm spectrele clasice de fluorescență ale probelor de ulei de măsline extravirgin (EVOO-3) și de ulei de floarea-soarelui, observăm schimbări considerabile în compoziția lor chimică. Spectrul probei de ulei de măsline extravirgin prezintă maxime intense la 295 nm și 365 nm, indicând un conținut ridicat de clorofile și polifenoli. Existența unor maxime mai puțin intense la 437 nm și 502 nm indică prezența carotenoidelor, în cantități reduse. În schimb, spectrul probei

de floarea-soarelui conține maxime de intensitate redusă la 295 nm, 345 nm, 365 nm și 390 nm, indicând prezența anumitor substanțe chimice fenolice și a clorofilelor. În plus, uleiul de floarea-soarelui conține o mai mare varietate de substanțe chimice observabile prin fluorescență la diferite lungimi de undă, indicând un spectru mai larg de pigmenți și antioxidanți. Diferențele de intensitate și distribuție a acestor maxime de fluorescență între cele două probe indică diferențe mari ale compoziției chimice și ale cantităților relative de substanțe chimice, influențate de originea și procedura de extracție a fiecărui tip de ulei. Într-o concluzionare finală, uleiul de măsline extravirgin are o cantitate mai mare de compuși fenolici și clorofile, dar uleiul de floarea-soarelui are mai multe carotenoide. Aceste distincții pot fi utilizate pentru identificarea și clasificarea diferitelor tipuri de uleiuri vegetale pe baza spectrelor lor de fluorescență, dezvăluind informații importante despre compoziția chimică și calitatea acestora.

Concluzii și perspective

a. Concluzii

Spectrele de fluorescență ale unora dintre celor mai consumate uleiuri vegetale comestibile (uleiul de măsline extra-virgin, uleiul de floarea-soarelui și uleiul de turte de măsline) au fost măsurate în condiții naturale. Spectrele de fluorescență ale uleiului de măsline extra-virgin au fost foarte diferite de cele ale celorlalte uleiuri vegetale. Aceste spectre pot fi măsurate rapid și ușor, fără niciun pretratament al probei de ulei, și ar putea fi eventual utilizate pentru identificarea uleiului de măsline virgin.

Uleiul extra-virgin de măsline prezintă un maxim de luminescență semnificativ la 670 nm, care se află în intervalul de lungime de undă utilizat pentru citire. Acest maxim este clar vizibil, iar culoarea roșie din această zonă poate fi observată cu ochiul liber. Acestea fiind menționate, spectrele de fluorescență ale uleiurilor extravirgine de măsline evidențiază fluorofori precum tocoferolii, compușii fenolici și clorofilele, care au un rol important în stabilirea calității uleiului. Aceste spectre pot fi utilizate pentru a monitoriza componenți specifici sau pentru a detecta proprietăți generale ale probei, rezultând o amprentă spectrală unică. Cât despre uleiul de floarea-soarelui și cel de turte de măsline, prezența substanțelor chimice fluorescente specifice în ambele uleiuri a fost demonstrată prin spectrul de fluorescență. Uleiul de floarea soarelui și uleiul de turte de măsline au prezentat profiluri distincte, putând permite cu o analiză mai amănunțită identificarea și diferențierea compozițiilor chimice. Examinarea a confirmat existența și concentrația mai multor componente, inclusiv clorofila și carotenii, care indică calitatea uleiurilor.

b. Perspective

Abordarea epifluorescenței frontale permite monitorizarea nedistructivă, în timp real, a calității uleiului. Variabilitatea spectrelor de fluorescență poate reflecta schimbări în compoziția chimică, degradarea uleiului sau contaminarea.

Utilizarea și perfecționarea metodelor de prelucrare a datelor multivariate (cum ar fi analiza componentelor principale și regresia vectorului suport) pot crește considerabil capacitatea de diferențiere și interpretare a spectrelor de fluorescență. Acest lucru va permite identificarea și cuantificarea mai precisă a componenților specifici din uleiuri, așadar, epifluorescența-ar putea fi combinată cu alte tehnici analitice, cum ar fi spectroscopia de absorbție în infraroșu (FTIR),

cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) sau spectrometria de masă (MS) pentru a oferi o imagine completă și detaliată a compoziției chimice și a calității uleiului.

Metodologia poate fi aplicată în diverse industrii, cum ar fi controlul calității alimentelor, analiza farmaceutică și monitorizarea mediului, oferind o modalitate rapidă și nedistructivă de a analiza compoziția chimică și de a descoperi impuritățile.

Bibliografie

- [1] 'lumescenta.pdf'.
- [2] J. R. Lakowicz, 'Chapter 1 Fluorescence Spectroscopy; Principles and Application to Biological Macromolecules', in *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 11, Elsevier, 1985, pp. 1–26. doi: 10.1016/S0167-7306(08)60570-0.
- [3] S. Faassen and B. Hitzmann, 'Fluorescence Spectroscopy and Chemometric Modeling for Bioprocess Monitoring', *Sensors*, vol. 15, no. 5, pp. 10271–10291, Apr. 2015, doi: 10.3390/s150510271.
- [4] M. N. Berberan-Santos, *Pioneering Contributions of Jean and Francis Perrinto Molecular Luminescence, In New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences; B. Valeur, J. –C. Brochon, Eds.; Springer Series on Fluorescence Methods and Applications; Springer Verlag (2001) pp 18-19.*
- [5] 'jablonski-diagram-2'. Accessed: Jun. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/>
- [6] B.-H. Jun, Ed., *Nanotechnology for Bioapplications*, vol. 1309. in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1309. Singapore: Springer Singapore, 2021. doi: 10.1007/978-981-33-6158-4.
- [7] J. Christensen, L. Nørgaard, R. Bro, and S. B. Engelsen, 'Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems', *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 6, pp. 1979–1994, Jun. 2006, doi: 10.1021/cr050019q.
- [8] K. Radotić, M. Stanković, D. Bartolić, and M. Natić, 'Intrinsic Fluorescence Markers for Food Characteristics, Shelf Life, and Safety Estimation: Advanced Analytical Approach', *Foods*, vol. 12, no. 16, p. 3023, Aug. 2023, doi: 10.3390/foods12163023.
- [9] M. H. Ahmad, A. Sahar, and B. Hitzmann, 'Fluorescence Spectroscopy for the Monitoring of Food Processes', in *Measurement, Modeling and Automation in Advanced Food Processing*, vol. 161, B. Hitzmann, Ed., in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 161. , Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 121–151. doi: 10.1007/10_2017_11.
- [10] M. Zandomenighi, L. Carbonaro, and C. Caffarata, 'Fluorescence of Vegetable Oils: Olive Oils', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 3, pp. 759–766, Feb. 2005, doi: 10.1021/jf048742p.

- [11] G. M. Strasburg and R. D. Ludescher, 'Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research', *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 3, pp. 69–75, Mar. 1995, doi: 10.1016/S0924-2244(00)88966-9.
- [12] C.A. Parker (Ed.), *Photoluminescence of Solutions with Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry.*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (1968), pp. 128-302.
- [13] D. Airado-Rodríguez, I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, and J. P. Wold, 'Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry', *J. Food Compos. Anal.*, vol. 24, no. 2, pp. 257–264, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jfca.2010.10.005.
- [14] S. Duraipandian, J. C. Petersen, and M. Lassen, 'Authenticity and Concentration Analysis of Extra Virgin Olive Oil Using Spontaneous Raman Spectroscopy and Multivariate Data Analysis', *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 12, p. 2433, Jun. 2019, doi: 10.3390/app9122433.
- [15] P. Baltazar, N. Hernández-Sánchez, B. Diezma, and L. Lleó, 'Development of Rapid Extra Virgin Olive Oil Quality Assessment Procedures Based on Spectroscopic Techniques', *Agronomy*, vol. 10, no. 1, p. 41, Dec. 2019, doi: 10.3390/agronomy10010041.
- [16] G. Buckland and C. A. Gonzalez, 'The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials', *Br. J. Nutr.*, vol. 113, no. S2, pp. S94–S101, Apr. 2015, doi: 10.1017/S0007114514003936.
- [17] H. Zaroual, C. Chénè, E. M. El Hadrami, and R. Karoui, 'Application of new emerging techniques in combination with classical methods for the determination of the quality and authenticity of olive oil: a review', *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 62, no. 16, pp. 4526–4549, Jun. 2022, doi: 10.1080/10408398.2021.1876624.
- [18] L. Schwingshackl, A.-M. Lampousi, M. P. Portillo, D. Romaguera, G. Hoffmann, and H. Boeing, 'Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials', *Nutr. Diabetes*, vol. 7, no. 4, pp. e262–e262, Apr. 2017, doi: 10.1038/nutd.2017.12.
- [19] M.-I. Covas, V. Konstantinidou, and M. Fitó, 'Olive Oil and Cardiovascular Health', *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 54, no. 6, pp. 477–482, Dec. 2009, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181c5e7fd.
- [20] F. Pérez-Jiménez, J. Ruano, P. Perez-Martinez, F. Lopez-Segura, and J. Lopez-Miranda, 'The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone', *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 10, pp. 1199–1208, Oct. 2007, doi: 10.1002/mnfr.200600273.

- [21] M. Ruiz-Canela and M. A. Martínez-González, 'Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease', *Maturitas*, vol. 68, no. 3, pp. 245–250, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.maturitas.2010.12.002.
- [22] J. López-Miranda *et al.*, 'Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008', *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 284–294, May 2010, doi: 10.1016/j.numecd.2009.12.007.
- [23] F. Barzi *et al.*, 'Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial', *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 4, pp. 604–611, Apr. 2003, doi: 10.1038/sj.ejcn.1601575.
- [24] V. Ruiz Gutiérrez, F. J. G. Muriana, and J. Villar, 'El aceite de oliva virgen y las enfermedades cardiovasculares. Perfil lipídico en plasma y composición lipídica de la membrana de eritrocito humano', *Grasas Aceites*, vol. 49, no. 1, pp. 9–29, Feb. 1998, doi: 10.3989/gya.1998.v49.i1.703.
- [25] J. A. Cayuela, K. Yousfi, M. Carmen Martínez, and J. M. García, 'Rapid Determination of Olive Oil Chlorophylls and Carotenoids by Using Visible Spectroscopy', *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 91, no. 10, pp. 1677–1684, Oct. 2014, doi: 10.1007/s11746-014-2515-1.
- [26] R. Estruch, 'Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial', *Ann. Intern. Med.*, vol. 145, no. 1, p. 1, Jul. 2006, doi: 10.7326/0003-4819-145-1-200607040-00004.
- [27] H. Ali, M. Saleem, M. R. Anser, S. Khan, R. Ullah, and M. Bilal, 'Validation of Fluorescence Spectroscopy to Detect Adulteration of Edible Oil in Extra Virgin Olive Oil (EVOO) by Applying Chemometrics', *Appl. Spectrosc.*, vol. 72, no. 9, pp. 1371–1379, Sep. 2018, doi: 10.1177/0003702818768485.
- [28] E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, and M. La Guardia, 'The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health', *Nutr. Res. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 98–112, Jun. 2005, doi: 10.1079/NRR200495.
- [29] 'chroma.pdf'.
- [30] V. F. Ignatovich, 'Enhancement of the antigenic activity and virulence of the vaccine strain E of Rickettsia prow azeki by passages in cell culture', *Acta Virol.*, vol. 19, no. 6, pp. 481–485, Nov. 1975.

- [31] G. Van Poppel and R. Goldbohm, 'Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention', *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 62, no. 6, pp. 1393S-1402S, Dec. 1995, doi: 10.1093/ajcn/62.6.1393S.
- [32] T. J. McQuistan *et al.*, 'Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study', *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 2, pp. 341–352, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.fct.2011.10.065.
- [33] B. Gordillo, L. Ciaccheri, A. G. Mignani, M. L. Gonzalez-Miret, and F. J. Heredia, 'Influence of Turbidity Grade on Color and Appearance of Virgin Olive Oil', *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 88, no. 9, pp. 1317–1327, Sep. 2011, doi: 10.1007/s11746-011-1787-y.
- [34] E. Sikorska *et al.*, 'Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage', *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 1, pp. 52–61, Jan. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01384.x.
- [35] A. Hassoun, A. Sahar, L. Lakhal, and A. Aït-Kaddour, 'Fluorescence spectroscopy as a rapid and non-destructive method for monitoring quality and authenticity of fish and meat products: Impact of different preservation conditions', *LWT*, vol. 103, pp. 279–292, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.021.
- [36] E. Sikorska, I. Khmelinskii, and M. Sikorski, 'Analysis of Olive Oils by Fluorescence Spectroscopy: Methods and Applications', in *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, D. Boskou, Ed., InTech, 2012. doi: 10.5772/30676.
- [37] 'Chromatographic_analysis_of_vegetable_oils_A_revie.pdf'.
- [38] M. Zandomenighi and G. Zandomenighi, 'Comment on Cluster Analysis Applied to the Exploratory Analysis of Commercial Spanish Olive Oils by Means of Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 14, pp. 5829–5830, Jul. 2005, doi: 10.1021/jf047797o.
- [39] F. Danjon, T. Fourcaud, and D. Bert, 'Root architecture and wind-firmness of mature *Pinus pinaster*', *New Phytol.*, vol. 168, no. 2, pp. 387–400, Nov. 2005, doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01497.x.
- [40] R. Cheikhousman, M. Zude, D. J.-R. Bouveresse, C. L. Léger, D. N. Rutledge, and I. Birlouez-Aragon, 'Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating', *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 382, no. 6, pp. 1438–1443, Jul. 2005, doi: 10.1007/s00216-005-3286-1.

- [41] V. T. Papoti and M. Z. Tsimidou, 'Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract', *Food Chem.*, vol. 112, no. 1, pp. 246–252, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.081.
- [42] '32-spectrofluorometer-system.html'. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <https://www.laser2000.es/en/optical-test-equipment/32-spectrofluorometer-system.html>
- [43] 'systems'. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: https://www.stellarnet.us/systems/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwsuSzBhCLARIsAicDm7l2Zu5m1sRrY1EH_6fnw8y8wJ_M_3OgxcnsyOspId2llxkvR6Rq2caApgMEALw_wcB
- [44] 'v-700-uvvisnir-spectrophotometers-2'. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <https://www.jasco.ro/produse/spectroscopie/v-700-uvvisnir-spectrophotometers-2/>
- [45] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Seventh edition. Australia: Cengage Learning, 2018.
- [46] 'spectrofluorimetre-jasco-fp-8050'. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <http://asco.ro/produse/spectroscopie/spectrofluorimetre-jasco-fp-8050/>
- [47] 'doc-800.pdf'. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <https://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-800.pdf>

Anexe

Anexa 1- Spectrometru de fluorescență StellarNet Inc.



Figura A1.1 Aparatura folosită pentru înregistrarea spectrelor de fluorescență clasică. Spectrometrul de fluorescență StellarNet Inc.[42]

Principiul de funcționare implică utilizarea unei surse de lumină, cum ar fi o lampă cu xenon, LED-uri sau diode laser, care emite un fascicul de lumină pentru a excita moleculele din probă. Moleculele absorb energia și emit lumină fluorescentă la o lungime de undă mai mare, pe măsură ce revin la starea fundamentală. Lumina fluorescentă trece printr-un monocromator sau filtru optic pentru a izola semnalul dorit și este detectată de un fotomultiplicator sau detector CCD, care convertește lumina în semnal electric. Acest semnal este analizat de un software specializat, care afișează datele sub forma unui spectru de fluorescență. Spectrometrele StellarNet sunt apreciate pentru versatilitatea lor, designul compact și portabil, precizia și sensibilitatea ridicată, fiind ideale pentru utilizarea în laborator sau pe teren, și sunt susținute de un software avansat ce permite o analiză detaliată a datelor de fluorescență[43].

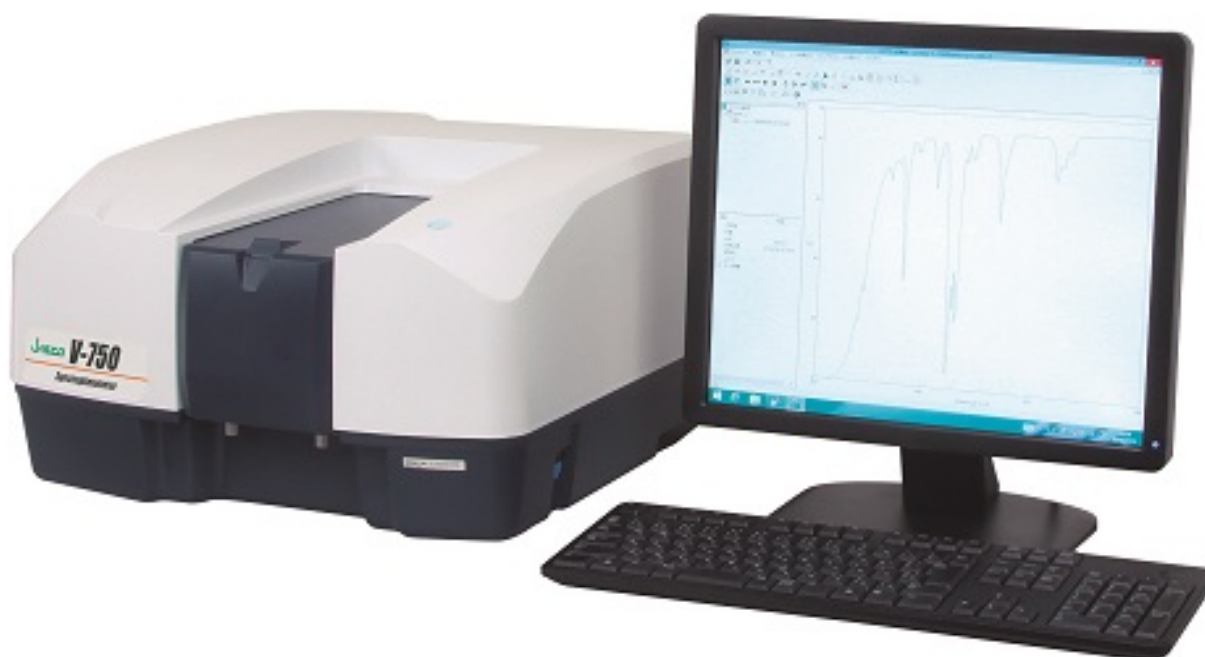
Anexa 2- Spectrofotometru cu dublu fascicul tip UV-VIS (V-750 Jasco, produs în Japonia)

Figura A2.1-Aparatul utilizat pentru efectuarea spectrelor de absorbție. Spectrofotometru UV-VIS (V-750 Jasco)[44]

Spectrofotometrul UV-VIS cu fascicul dublu funcționează pe baza ideii de detectare a absorbției luminii de către o probă la diferite lungimi de undă în benzile ultraviolete (UV) și vizibile (VIS). Aparatul utilizează două fascicule de lumină: unul prin probă și un fascicul de referință prin intermediul unui solvent sau al unei celule goale. Sursa de lumină (adesea o lampă cu xenon sau deuteriu pentru UV și o lampă cu tungsten pentru VIS) produce un fascicul de lumină care este separat în mai multe lungimi de undă de un monocromator. Cele două fascicule de lumină sunt direcționate către detectoare diferite sau către același detector și se detectează diferența de intensitate dintre fasciculele de probă și de referință. Acest lucru compensează modificările de intensitate ale sursei de lumină și alte variabile instrumentale, rezultând o măsurare precisă a absorbției. Rezultatele sunt afișate sub forma unui spectru de absorbție, care arată cât de multă lumină este absorbită la fiecare lungime de undă, permițând identificarea și cuantificarea substanțelor din probă[45].

Anexa 3- Spectrofluorimetru FP-8000 (Jasco)

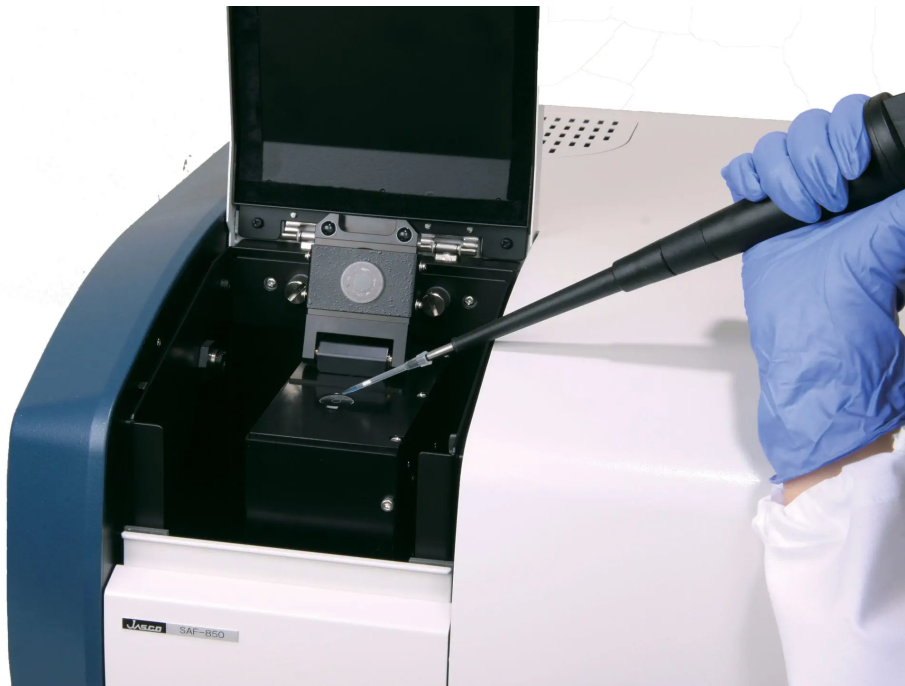


Figura A3.1 Spectrofluorimetru FP-8000 cu accesoriul pentru modul epi-fluorescență[46]

Spectrofluorimetrul FP-8000, a fost utilizat cu două accesorii: unul pentru modul epi-fluorescenței (Figura A3.1) și celălalt pentru modul clasic (utilizat în analiza fluorescenței frontale clasice).

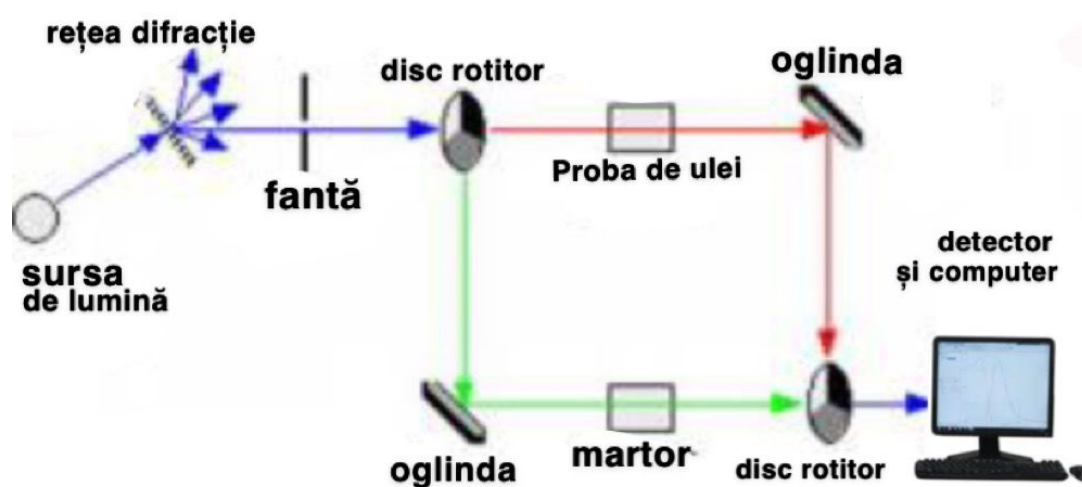


Figura A3.2 Schema generală de funcționare a unui spectrofluorimetru FP-8000

Acesta funcționează prin utilizarea unei surse de lumină, de obicei o lampă cu xenon sau un LED, pentru a emite un fascicul de lumină de excitație ales de un monocromator. Lumina de excitație este direcționată către probă, unde moleculele fluorescente absorb energia și produc lumină cu o lungime de undă mai mare. Un al doilea monocromator selectează lumina emisă, care este apoi detectată de un detector fotomultiplicator sau CCD, transformând-o în date electronice care pot fi studiate și afișate sub forma unui spectru de fluorescență. Lumina de excitație lovește fața probei la un unghi, de obicei de 90 de grade, pentru a reduce reflexia internă și reabsorbția, în timp ce detectorul este perpendicular pe fața probei[47].

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Șarpe-Mîrzan Florina-Irina declar că Lucrarea de licență- Studiul fluorescenței uleiului de măsline, pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2024, sub îndrumarea Conf. dr. Dana Maniu, 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,

26.06.2024

Nume,

Șarpe-Mîrzan Florina-Irina

Semnătură

