



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00821**

(22) Data de depozit: **10/12/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2022 BOPI nr. **6/2022**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR. 3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **LEOPOLD LOREDANA FLORINA, STR. ALMAȘULUI, NR. 5, AP. 13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **COMAN CRISTINA, STR. EUGEN IONESCO NR. 13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **IANCU ȘTEFANIA DANA, STR. ARMONIEI, NR. 3, BL. 58, AP. 4, BRAȘOV, BV, RO;**
• **ȘTEFANCU ANDREI, STR. SALCĂMILOR, NR. 36, SAT MĂNĂȘTIRENI, COMUNA UNȚENI, CJ, RO;**
• **LEOPOLD NICOLAE, STR. ALMAȘULUI NR. 5, AP. 13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE DETECȚIE A NANOPARTICULELOR DE TiO₂, ZnO ȘI Ag ÎN MATRICEA VEGETALĂ PRIN MICROSCOPIE ÎN CÂMP ÎNTUNECAT CUPLATĂ CU IMAGISTICĂ HIPERSPECTRALĂ(VIS-NIR)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de detecție a nanoparticulelor de TiO₂, ZnO și Ag în diferite matrici vegetale cum ar fi rădăcină, tulpină, frunză sau semințe prin microscopie în câmp întunecat, cuplată cu imagistică hiperspectrală în domeniul vizibil și infraroșu apropiat Vis - NIR. Procedeu de detecție conform invenției constă în depunerea unei secțiuni de grosime micrometrică din matricea vegetală pe o lamelă de microscop

și vizualizarea probei în câmp întunecat, înregistrarea spectrului luminii împrăștiată în domeniul 400...1000 nm în fiecare punct al câmpului focal și identificarea în imaginea hiperspectrală a fiecărei clase de nanoparticule TiO₂, Zn și Ag pe baza caracteristicilor spectrale.

Revendicări: 1
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Procedeu de detecție a nanoparticulelor de TiO₂, ZnO și Ag în matricea vegetală prin microscopie în câmp întunecat cuplată cu imagistică hiperspectrală (Vis-NIR)

Invenția se referă la un procedeu de detecție a nanoparticulelor de TiO₂, ZnO și Ag în diferite matrici vegetale cum ar fi rădăcină, tulpină, frunză sau semințe prin microscopie în câmp întunecat (dark field) cuplată cu imagistică hiperspectrală în domeniul vizibil și infraroșu apropiat (Vis-NIR).

Impactul implementării soluțiilor nanotehnologice în produsele de consum, se regăsește și în deșeurile urbane, prin nanostructurile ce ajung în stațiile de epurare prin intermediul apei reziduale. Printre acestea se regăsesc și nanoparticulele de TiO₂, ZnO și Ag. Nanoparticulele de TiO₂ sunt excesiv folosite în cremele de protecție solară, nanoparticulele de ZnO sunt folosite în suprafețe de protecție împotriva zgârieturilor, vopsele rezistente la crăpături, acoperiri anti-graffiti pentru pereți, protecții solare transparente, țesături rezistente la pete, ferestre cu autocurățare, iar nanoparticulele de Ag pot fi întâlnite în diverse soluții antiseptice (creme, vopsele).

Nămolul din stațiile de epurare este folosit ca îngrășământ în agricultură, astfel că reziduurile de nanoparticule pot intra în lanțul trofic prin internalizarea acestora în plantele din culturi agricole. Se impune astfel monitorizarea biodistribuției nanoparticulelor în matrici vegetale prin metode senzorialice eficiente [D.T. Donia, M. Carbone, "Fate of the nanoparticles in environmental cycles", *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol.16, pp.593-600, 2019].

Microscopia în câmp întunecat combinată cu imagistica hiperspectrală reprezintă o abordare optică relativ nouă, cu potențial mare privind identificarea și determinarea calitativă și cantitativă a nanoparticulelor în matricea vegetală. Microscopia optică reprezintă o metodă universală utilizată, deoarece oferă o observație directă și fiabilă, însă este limitată de rezoluția sistemului optic. Microscopia în câmp luminos se bazează pe detecția luminii transmise, care este ideală pentru obiectele care absorb lumina pe un fundal neabsorbant, însă prezintă câteva dezavantaje cum ar fi, o rezoluție optică scăzută, un raport semnal-zgomot mic și deseori un aspect nefocalizat al probei. Dimpotrivă, microscopia în câmp întunecat se bazează pe iluminarea indirectă a probei, fiind captată doar lumina împrăștiată de probă, eliminând astfel zgomotul de fond. Microscopia în câmp întunecat oferă un contrast ridicat, adecvat pentru observarea obiectelor cu contrast scăzut, de obicei nevizibile prin microscopia convențională în câmp luminos.

Imagistica hiperspectrală poate completa microscopia în câmp întunecat, prin posibilitatea de a achiziționa spectrul luminii împrăștiată de probă în domeniul vizibil și infraroșu apropiat

(400–1000 nm) în fiecare punct din câmpul focal. Astfel, pe lângă analiza morfologică a probelor, obținută prin microscopia în câmp întunecat, este posibilă și analiza structurală a probelor, pe baza spectrului luminii împrăștiată de probă, din fiecare punct al câmpului focal. Prin urmare, prin vizualizarea microscopică în câmp întunecat și a analizei hiperspectrale se poate determina distribuția spațială a probei și se pot efectua determinări legate de componența moleculară a probei [X. Dong, M. Jakobi, S. Wang, M. H. Köhler, X. Zhang, A.W. Koch, "A review of hyperspectral imaging for nanoscale materials research", *Applied Spectroscopy Reviews* vol.54, pp.285-305, 2019].

Invenția prezintă o modalitate rapidă și relativ simplă pentru detecția nanoparticulelor în matricea vegetală, bazată pe vizualizarea directă a acestora în secțiuni de țesut vegetal sau într-un film subțire obținut prin omogenizare (de exemplu din făina obținută din semințele de cereale). Imagistica hiperspectrală în combinație cu microscopia în câmp întunecat se pretează în mod special pentru vizualizarea obiectelor micro- și nanometrice ce împrăștie puternic lumina. Acesta este și cazul nanoparticulelor de TiO_2 , ZnO și Ag : dioxidul de titan este cel mai utilizat pigment alb din cauza luminozității sale și a indicelui de refracție foarte ridicat, nanoparticulele de Ag în particular, împrăștie puternic lumina datorită proprietăților plasmonice. Pe lângă imaginea luminoasă a obiectelor nanometrice mai sus menționate, microscopia hiperspectrală permite înregistrarea unui spectru în fiecare punct al câmpului focal, în domeniul spectral 400-1000 nm, diferitele clase de nanoparticule prezentând un spectru caracteristic. Pe baza proprietăților optice, nanoparticulele TiO_2 , ZnO și Ag pot fi detectate și identificate în matricea vegetală cu limita de detecție de 0.01 mg/g.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției. Pentru detecția nanoparticulelor TiO_2 , ZnO sau Ag din matricea vegetală s-a urmărit următorul protocol de preparare al probelor:

- S-a curățat o lamelă de microscop cu etanol în baie de ultrasunete timp de 15 minute pentru îndepărtarea particulelor de praf de pe suprafața acesteia.
- După uscarea lamelei de microscop s-a depus pe aceasta o secțiune micrometrică din matricea vegetală, ce a fost tratată în prealabil cu o clasă de nanoparticule: TiO_2 , ZnO sau Ag .
- Lamela de microscop a fost plasată sub microscopul optic ce permite înregistrarea datelor hiperspectrală în câmpul focal, la vizualizare microscopică în câmp întunecat. Microscopul este dotat cu o sursă ce emite lumină în domeniul spectral 400-1000 nm. În cadrul mapării suprafeței probei, au fost achiziționate imagini optice și date hiperspectrale cu obiectivele cu mărire de 10x și 40x, timpul de expunere fiind de 0.2 secunde în fiecare linie a câmpului focal.

- Analiza imaginii a permis crearea de hărți cu distribuțiile nanoparticulelor de TiO_2 , ZnO sau Ag în probe prin marcarea punctelor unde spectrele de împrăștiere din imaginea hiperspectrală coincid cu domeniul spectral specific împrăștierii luminii de către nanoparticulele de TiO_2 , ZnO sau Ag . Filtrarea semnalelor spectrale a fost realizată astfel: au fost identificate punctele din imaginea spectrală a căror spectre de împrăștiere au un maxim la 520 ± 10 nm pentru nanoparticulele de TiO_2 , la 490 ± 10 nm pentru nanoparticulele de ZnO și 490 ± 10 nm pentru nanoparticulele de Ag .

În figurile anexate, care fac parte din prezenta invenție, sunt redate următoarele:

Figura 1 (a) prezintă o imagine reprezentativă pentru observarea nanoparticulelor de TiO_2 uscate pe lamela de microscop, obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate; (b) spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de TiO_2 cu un maxim spectral la valoarea 520 nm.

Figura 2 (a) prezintă o imagine reprezentativă pentru pentru observarea nanoparticulelor de ZnO uscate pe lamela de microscop, obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate; (b) spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de ZnO cu maxime spectrale la valorile 620 și 490 nm.

Figura 3 (a) prezintă o imagine reprezentativă pentru observarea nanoparticulelor de Ag uscate pe lamela de microscop, obținută pe baza datelor hiperspectrale; (b) spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de Ag ce prezentă un maxim spectral la valoarea 490 nm.

Figura 4 (a) prezintă o imagine reprezentativă pentru observarea nanoparticulelor de ZnO în matricea semințelor de soia, concentrația nanoparticulelor ZnO fiind de 0.1 mg/g probă vegetală. Imaginea a fost obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate; (b) distribuția spațială a nanoparticulelor de ZnO în maricea semințelor de soia, după filtrarea imaginii hiperspectrale pe baza intensității la lungimea de undă de 490 ± 10 nm, valoare caracteristică împrăștierii luminii de către nanoparticulele de ZnO .

REVENDICĂRI

Metodologie de detecție a nanoparticulelor de TiO_2 , ZnO și Ag în matrici vegetale, caracterizată prin aceea că se înregistrează spectrul luminii împrăștiată în domeniul Vis-NIR în fiecare punct din câmpul focal al imaginii observate prin microscopie în câmp întunecat.

(a)



(b)

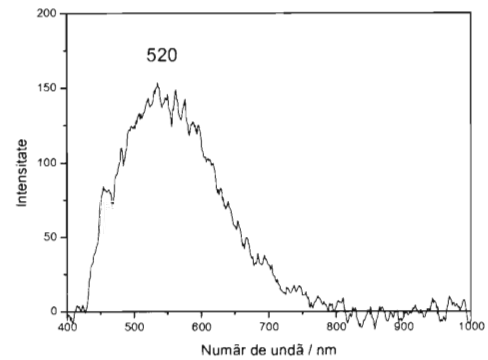
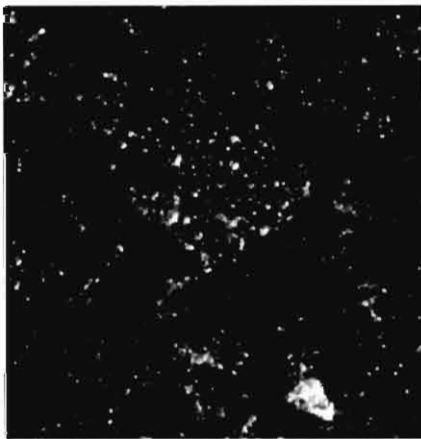


Figura 1. (a) Vizualizarea nanoparticulelor de TiO_2 uscate pe lamela de microscop. Imagine obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate în observare microscopică în câmp întunecat. (b) Spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de TiO_2 .

(a)



(b)

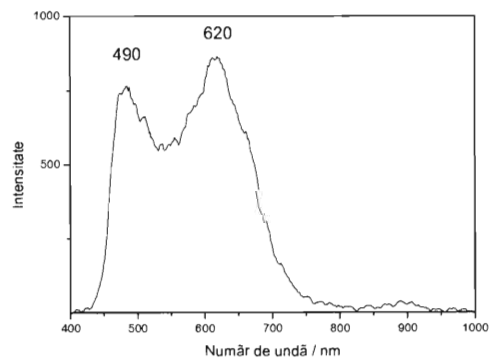


Figura 2. (a) Vizualizarea nanoparticulelor de ZnO uscate pe lamela de microscop. Imagine obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate în observare microscopică în câmp întunecat. (b) Spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de ZnO .



(a)



(b)

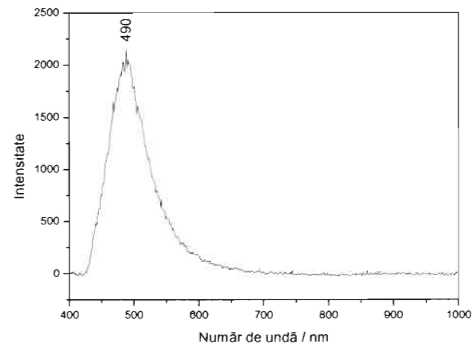
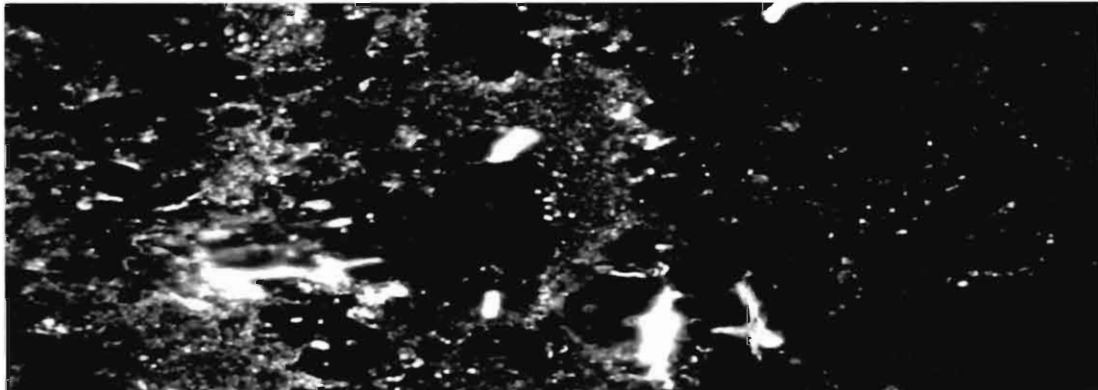


Figura 3. (a) Vizualizarea nanoparticulelor de Ag uscate pe lamela de microscop. Imagine obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate în observare microscopică în câmp întunecat; (b) Spectrul de împrăștiere caracteristic nanoparticulelor de Ag.

(a)



(b)



Figura 4. (a) Imagine obținută pe baza datelor hiperspectrale înregistrate în observare microscopică în câmp întunecat. (b) Distribuția spațială a nanoparticulelor de ZnO (pixeli de culoare verde în imagine). Punctele identificate prezintă spectre caracteristice nanoparticulelor de ZnO.