



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00057**

(22) Data de depozit: **27/01/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2023** BOPI nr. **10/2023**

(41) Data publicării cererii:  
**29/07/2016** BOPI nr. **7/2016**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN  
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I, NR.11, IAȘI,  
IS, RO**

(72) Inventatori:  
• **ZAHARIA MARIUS-MIHAI,  
STR. TINERETULUI, BL. 14, SC. B, AP. 12,  
BUHUȘI, BC, RO;**  
• **GRADINARU VASILE-ROBERT,  
STR. AEROPORTULUI, BL. 1D, SC. V,  
AP. 19, IAȘI, IS, RO;**  
• **ZAHARIA ELENA- ADELINA,  
STR. TINERETULUI, BL. 14, SC. B, AP. 12,  
BUHUȘI, BC, RO;**  
• **MURARIU MANUELA, REDIU, IS, RO;**  
• **DROCHIOIU GABI, STR.PETRU RAREȘ  
NR.19, C 15, TÂRGU FRUMOS, IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**LOZINSKY O. V., LUSHCHAK O. V.,  
STOREY J. M., STOREY K. B., LUSHCHAK  
V., "THE MITOCHONDRIAL UNCOUPLER  
2,4-DINITROPHENOL ATTENUATES  
SODIUM NITROPRUSSIDE - INDUCED  
TOXICITY IN DROSOPHILA  
MELANOGASTER: POTENTIAL  
INVOLVEMENT OF FREE RADIACLS.  
COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. C. TOXICOL.  
PHARMACOL., VOL. 158(4), PP. 244-252,  
2013; PREBBLE J. N., "STUDIES IN  
HISTORY AND PHILOSOPHY OF SCIENCE  
PART C; STUDIES IN HISTORY AND  
PHILOSOPHY OF BIOLOGICAL AND  
BIOMEDICAL SCIENCES, VOL. 41(3),  
PP. 253-262, 2010; WU Y. N., MUNHALL A.  
C., JOHNSON S. W., "MITOCHONDRIAL  
UNCOUPLING AGENTS ANTAGONIZE  
ROTENONE ACTIONS IN RAT  
SUBSTANTIA NIGRA DOPAMINE  
NEURONS, BRAIN RES., VOL. 1395,  
PP. 86-93, 2011**

(54) **METODĂ COLORIMETRICĂ DE DETERMINARE A  
ACTIVITĂȚII AGENȚILOR DECUPLANȚI AI FOSFORILĂRII  
OXIDATIVE**



# RO 131288 B1

1           Invenția se referă la o metoda colorimetrică de determinare a activității agenților  
2 decuplanți ai fosforilării oxidative bazat pe formarea alcoolului etilic în radiculele plantelor  
3 superioare și în drojdia de bere sub acțiunea dinitrofenolilor și al altor compuși chimici cu  
4 potențială acțiune de decuplare.

5           Este cunoscut din articol **Lozinsky O. V., Lushchak O. V., Storey J. M., Storey K.  
6 B., Lushchak V., “The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates sodium  
7 nitroprusside-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*: potențial involvement of  
8 free radicals”, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **158(4), 244-252, 2013**  
9 faptul că utilizând apa distilată ca martor care nu are acțiune decuplantă și 2,4-DNP, un  
10 agent de decuplare clasic, drept etalon se poate determina intensitatea acțiunii decuplante  
11 a celorlalți compuși chimici, dacă aceștia sunt într-adevăr agenți decuplanți.**

12           Este cunoscut din articol **Prebble J.N., *Studies in History and Philosophy of  
13 Science Part C; Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical  
14 Sciences*, vol. **41(3), 253-262, 2010** faptul că originile fosforilării oxidative, cunoscute inițial  
15 sub numele de fosforilare aerobă, au aparut din trei domenii de cercetare ale metabolismului  
16 muscular, fosforilarea creatinei, metabolismul aerob al acidului lactic în mușchi și studii  
17 despre natura și rolul adenozin trifosfatului (ATP), un lanț transportor de electroni adică un  
18 sistem de reacții biochimice prin care compușii bogăți în atomi de hidrogen ( $H^+$ ) de tipul  
19 NADH și  $FADH_2$  reduc succesiv unele feroproteine, chinonele și citocromii b, c, c;**

20           De asemenea este cunoscut din articol **Wu Y.N., Munhall A.C., Johnson S.W.,  
21 *Mitochondrial uncoupling agents antagonize rotenone actions in rat substantia nigra  
22 dopamine neurons. Brain Res.*, **1395, 86-93, 2011** un studiu de a testa ipoteza că agenții  
23 de decuplare a fosforilării oxidative ar antagoniza efectul rotenonei asupra curentului NMDA  
24 decuplarea ușoară a fosforilării oxidative reduce generarea de specii reactive de oxigen  
25 (ROS).**

26           Prin fosforilare oxidativă se înțelege formarea moleculelor de acid adenozin-trifosforic  
27 (notat aici ATP), bogate în energie, în cadrul lanțului transportor de electroni existent în  
28 matricea mitocondrială a organismelor eucariote [**Lehninger A., L., *Biochimie, Ed. Tehnică,*  
29 **2, 473-501, 547-572, 1987**]. Acest proces este esențial pentru toate aspectele vieții celulare  
30 în organismele aerobe, deoarece ATP-ul constituie principala lor sursă de energie utilizabilă.  
31 Prin lanț transportor de electroni se înțelege sistemul de reacții biochimice prin care compușii  
32 bogăți în atomi de hidrogen ( $H^+$ ) de tipul NADH și  $FADH_2$  reduc succesiv unele feroproteine,  
33 chinonele și citocromii b, c, c; acesta din urmă, citocromul a, reduce oxigenul molecular ajuns  
34 în celule în decursul procesului de respirație cu formare de molecule de apă. Energia  
35 rezultată din fiecare moleculă de NADH consumată și, respectiv, fiecare moleculă de  
36 flavinadeninucleotidă redusă (notată aici  $FADH_2$ ) este înmagazinată în câte 3 molecule  
37 de ATP și, respectiv, 2 molecule de ATP .**

38           Agenții de decuplare sunt compuși chimici de natură organică sau proteică ce inhibă  
39 formarea moleculelor de ATP (acid adenozin-trifosforic) în procesul de respirație a  
40 organismelor eucariote. Energia rezultată în procesul respirator în reacția globală a NADH  
41 și  $FADH_2$  cu oxigenul nu se acumulează sub forma moleculelor de ATP, ci se eliberează sub  
42 formă de căldură. Prin eucariote se înțeleg organismele celulare care posedă un nucleu bine  
43 diferențiat. Respirația și formarea de ATP în procesul respirator are loc în astfel de celule,  
44 dar la nivelul unor corpusculi subcelulari ce poartă denumirea de mitocondrii. Acestea se  
45 deosebesc de organismele anaerobe, numite și organisme procariote, care folosesc o altă  
46 strategie de a obține energie și anume prin intermediul procesului de fermentație. De  
47 asemenea, organismele procariote posedă un nucleu nediferențiat în celule, iar oxigenul este

toxic pentru acestea. Procesul de fermentație reprezintă eliberarea energiei din moleculele de glucoză și alte zaharuri în absența oxigenului, sub acțiunea unor enzime specifice, cu formare de alcool etilic [Klein D. W., Lansing M., Harley J., *Microbiology*, 6th ed., New York: McGraw-Hill, 2006].

Sunt descrise în literatură procesele biochimice de procurare a energiei prin respirație, adică prin arderea în celule a zaharurilor în prezența oxigenului molecular, iar energia rezultată este înmagazinată sub forma moleculelor de ATP, în schimb, în lipsa oxigenului, în celulele eucariotelor apar o serie de procese fermentative care conduc la eliberarea unei cantități mai mici de energie, înmagazinată într-un număr relativ mai mic de molecule de ATP, în decursul proceselor fermentative rezultă și molecule de alcool etilic [Cavaliere D., McGovern P. E., Hart D. L., Polsinelli M., *Evidence for S. Cerevisiae fermentation in ancientwine*, J., Mol., Evol., 57, 226-232, 2003].

Deși există numeroși agenți decuplanți, nu este cunoscută o metodă eficientă și simplă de evidențiere a acțiunii acestora și, în consecință, de clasificare a substanțelor chimice funcție de gradul lor de decuplare [Barros M. H., Bandy, B., Tahara E. B., Kowaltowski A. J., *Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 279, 49883-49888, 2004].

Dinitrofenolii și alți agenți decuplanți ai fosforilării oxidative de respirație inhibă oxidarea glucozei cu oxigenul din atmosferă cu formare de dioxid de carbon și apă și eliberare de ATP. Mai mult decât atât, acești agenți stimulează procesele fermentative ale glucozei cu formare de alcool etilic [Shavell V. I., Fletcher N. M., Jiang Z. L., Saed G. M., Diamond M. P., *Uncoupling oxidative phosphorylation with 2,4-dinitrophenol promotes development of the adhesion phenotype*. Fertility and Sterility, 97(3), 729-733, 2012]. De aceea, măsurarea cantității de alcool formate sub acțiunea agenților de decuplare poate fi o măsură a activității acestora. Trecerea de la respirație la fermentație sub acțiunea decuplanților poate fi evidențiată utilizând diverse organisme vii cum ar fi drojdia de bere, plantele superioare sau chiar țesuturi vegetale ce conțin încă celule intacte. Se pot folosi de exemplu radiclele de grâu sau porumb, tratate pentru scurt timp cu 2,4-dinitrofenol sau alți agenți decuplanți. Dacă țesutul respectiv nu mai are celule intacte, atunci are loc numai fermentația alcoolică indiferent dacă se introduce decuplantul sau nu, deoarece enzimele caracteristice procesului de fermentație nu sunt afectate de distrugerea celulelor și mitocondriilor, în timp ce respirația se desfășoară în celule, numai la nivelul mitocondriilor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în optimizarea unor parametrii de lucru cum ar fi durata tratamentului materialului vegetal cu compoziții chimice de analizat, cantitatea de material luată în lucru, modalitatea de eliberare controlată a alcoolului etilic format respectiv captarea sa după evaporare la 55°C, măsurarea acțiunii decuplante a unor compuși chimici prin determinarea cantității de alcool etilic produs de celulele vii, sub acțiunea acestora.

Metoda conform invenției se bazează pe faptul că, sub acțiunea agenților decuplanți, este inhibată respirația celulelor organismelor eucariote și se formează alcoolul etilic, ce poate fi determinat colorimetric prin reducerea bicromatului de potasiu ( $K_2Cr_2O_7$ ), de culoare portocalie, în mediu puternic acid ( $H_2SO_4$ ) la săruri de crom (III) de culoare verde. Astfel, utilizând apa distilată ca martor care nu are acțiune decuplantă și 2,4-DNP, un agent de decuplare clasic, drept etalon, se poate determina intensitatea acțiunii decuplante a celorlalți compuși chimici, dacă aceștia sunt într-adevăr agenți decuplanți.

# RO 131288 B1

1 În principiu, într-un vas de sticlă închis cu capac prevăzut intern cu un al doilea vas  
de dimensiuni mai mici ce conține materialul vegetal tratat în prealabil cu soluții de agenți de  
3 decuplare sau de alți compuși chimici analizați și o soluție de hidroxid de sodiu de  
concentrație 0,1N (NaOH).

5 În vasul mare, exterior celui în care s-a plasat materialul vegetal, se introduce o  
soluție de  $K_2Cr_2O_7$  și  $H_2SO_4$  (fig. 1). După închiderea ermetică a vasului exterior, întregul  
7 dispozitiv se termostatează la o temperatură de aproximativ  $55^\circ C$ , cel puțin o oră, în scopul  
evaporării alcoolului etilic, rezultat în urma biosintezei, din vasul interior și captarea sa în cel  
9 exterior, în care are loc oxidarea alcoolului și reducerea bicromatului de potasiu, reacție care  
poate fi pusă în evidență pe baza virajului de culoare a soluției de la portocaliu la verde. Din  
11 soluția de culoare verde, rezultată, se prelevează un volum bine determinat sau întregul  
volum de soluție și se diluează cu apă distilată, astfel încât maximele de absorbție ale  
13 spectrelor rezultate, cu ajutorul unui spectrofotometru sau colorimetru, să nu depășească  
valoarea 1. În paralel, se realizează o curbă de etalonare folosind alcool etilic (în domeniul  
15 de concentrație 0-5 mM), în vederea determinării exacte a concentrației alcoolului etilic  
format sub acțiunea agenților decuplanți.

17 Metoda colorimetrică de determinare a activității agenților decuplanți ai fosforilării  
oxidative conform invenției, prezintă o serie de avantaje:

19 - este singura metodă de evidențiere a acțiunii decuplanților și se bazează pe  
determinarea alcoolului etilic rezultat sub acțiunea acestora;

21 - deși reacția cu bicromatul de potasiu a alcoolului etilic format este cunoscută, însă  
eliberarea sa controlată, sub acțiunea hidroxidului de sodiu la  $55^\circ C$ , într-un vas închis și  
23 captarea sa în soluția de bicromat, nu a fost descrisă până în prezent;

25 - evidențierea acțiunii decuplante este simplă și ușor de realizat într-un laborator de  
chimie sau biochimie cu dotări modeste;

27 - prin definiție agenții decuplanți produc trecerea de la respirație la fermentație, iar  
avantajul metodei constă în aceea că determină cantitativ principalul produs de fermentație;

29 - măsurătorile colorimetrice sunt precise și exacte, permițând diferențierea netă între  
capacitatea de decuplare a unor diferiți agenți decuplanți;

31 - curba de calibrare se poate realiza, utilizând alcool etilic de diferite concentrații, la  
diferite lungimi de undă, cea mai potrivită fiind măsurarea absorbantei în ultraviolet, la  
350 nm;

33 - poate constitui un test vizual rapid deoarece schimbarea culorii sub acțiunea  
decuplanților poate fi observată direct în vasul de reacție.

35 Măsurarea a acțiunii decuplante a unor compuși chimici conform invenției se  
realizează prin determinarea cantității de alcool etilic produs de celulele vii, sub acțiunea  
37 acestora. De asemenea, măsurătorile se efectuează printr-un procedeu nou bazat pe reacția  
cunoscută a bicromatului de potasiu cu alcoolul etilic, pentru care au fost optimizați o serie  
39 de parametri de lucru: durata tratamentului materialului vegetal cu compușii chimici de  
analizat, cantitatea de material luată în lucru, modalitatea de eliberare controlată a alcoolului  
41 etilic format respectiv captarea sa după evaporare la  $55^\circ C$  și stabilirea parametrilor analitici  
ai reacției propriu zise. Procedeu descris nu necesită instalații și dispozitive suplimentare,  
43 în afara celor utilizate curent în laboratoarele de chimie și biochimie.

În continuare sunt prezentate 2 modalități de realizare a invenției.

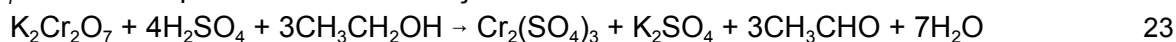
## 45 Exemplul 1

47 Se taie cu o foarfecă radiclele proaspăt recoltate (rădăcini de plante tinere, numite  
și plantule) de grâu, porumb sau alte plante superioare. Din aceste radicle secționare, se  
cântăresc în duplicat o cantitate de 1 g de material vegetal. Separat, în pahare de tip

# RO 131288 B1

Berzelius sau echivalente, se pipetează câte 5 mL de soluție proaspăt preparată de 2,4-DNP sau dintr-o altă substanță care ulterior va fi supusă analizei, având o concentrație de 50 pM, peste care se adaugă fragmentele de radicle și se lasă în repaos timp de 15 min pentru penetrarea compușilor în materialul vegetal. După 15 min, rădăcinile se scot și se tamponază folosind hârtie de filtru pentru îndepărtarea lichidului rezidual, fiind incubate, la temperatura camerei, timp de 30 min în vederea satisfacerii procesului biochimic/biologic de fermentație alcoolică. Pentru determinarea indirectă a nivelului de alcool etilic produs, se folosește dispozitivul din fig. 1. Acest dispozitiv constă dintr-un vas prevăzut cu două compartimente; unul central și unul extern acestuia, în care se află primul. În compartimentul central se adaugă rădăcinile tratate peste care se pipetează câte 2 mL de NaOH (0,1 N), cu scopul eliminării produșilor secundari de reacție cum ar fi aldehida acetică. În compartimentul extern se pipetează succesiv câte 3 mL de  $K_2Cr_2O_7$  ( $10^{-2}$  M) și 3 mL de  $H_2SO_4$  (96%). După adăugarea acestor componente, vasul se incubează pe o plită electrică, timp de 1 h, la temperatura de  $55^\circ C$ .

În decursul procesului de incubare are loc evaporarea alcoolului etilic format și transformarea aldehidei acetice rezultate în urma procesului de fermentație în acetat de sodiu și alcool etilic. Alcoolul etilic rezultat în procesul de fermentație este captat în soluția acidă de bicromat de potasiu. Amestecul de reacție rezultat ce conține bicromat de potasiu nereacționat, acid sulfuric, alcool etilic și vapori de apă captați se prelevează și diluează la un volum final de 10 mL cu apă distilată. Spectrul de absorbție al soluției rezultate este înregistrat în domeniul spectral  $A = 250-650$  nm (fig. 2...4). Reacția alcoolului etilic cu  $K_2Cr_2O_7$  este redată prin următoarea ecuație chimică:



Așadar, formarea alcoolului etilic este evidențiată prin această reacție de culoare, deoarece soluția se colorează în verde, ca urmare a reducerii cromului(VI) la crom(III). Concomitent, se formează și aldehida acetică, ce poate fi decelată și după miros. Cantitatea de alcool format este însă dependentă de gradul de decuplare a fosforilării oxidative, de către dinitroderivați sau de alți compuși care manifestă acțiune asemănătoare decuplantă, precum și de concentrația și de timpul de acțiune al acestora.

Din fig. 2, ce reprezintă etalonarea metodei de lucru, rezultă următoarele: soluția de  $K_2Cr_2O_7$   $10^{-2}$  M prezintă un maxim de absorbție maximă la 350 nm cu o intensitate de 0,450; tratamentul cu apă distilată al radiclelor (control) a condus la o valoare a absorbantei de 0,269, caz în care nu s-a evidențiat reducerea bicromatului de potasiu. Soluția de ioni de  $Cr^{3+}$   $10^{-2}$  M, de culoare verde, utilizată pentru evidențierea procesului de reducere a bicromatului de potasiu, a prezentat mai multe benzi de absorbție (la 296 nm, 403 nm respectiv 573 nm cu intensitățile de 0,082, de 0,061 respectiv de 0,049). Soluția rezultată prin tratarea radiclelor cu o soluție de 2,4-DNP de concentrație 50  $\mu M$  a prezentat un maxim de absorbție la 350 nm de intensitate 0,014, indicând formarea alcoolului etilic ce a redus bicromatul de potasiu la săruri de crom trivalent, soluția finală de culoare verde conține astfel  $Cr_2(SO_4)_3$ .

În acest exemplu soluția de  $Cr^{3+}$   $10^{-2}$  M a fost folosită pentru a evidenția modificările spectrale în cazul în care întreaga cantitate de bicromat de potasiu ar fi redusă. Totodată, folosirea soluției de 2,4-DNP 50  $\mu M$  drept etalon, pentru determinarea activității de decuplare în cazul în care este estimată activitatea decuplantă a altor compuși investigați.

Testele realizate cu diferiți compuși au condus la modificări spectrale ale soluției acide de  $K_2Cr_2O_7$  datorită producerii unor cantități diferite de alcool etilic în funcție de natura compusului investigat. Surprinzător, acțiunea decuplantă cea mai intensă a fost observată în cazul p-nitrobenzaldehydei care a depășit-o pe aceea a etalonului folosit, 2,4-DNP. 2,4-Dinitroclorbenzenul nu a prezentat acțiune decuplantă, iar toxicitatea acestuia ar putea să

# RO 131288 B1

1 fie cauzată de alte proprietăți ale acestuia, cum ar fi reacția cu grupările aminice ale pro-  
teinelor și acizilor nucleici. Dinitrofenil-S-glutationul, dimpotrivă, a prezentat o acțiune stimu-  
3 latoare asupra respirației, inhibând producția de alcool prin fermentație. Celelalte substanțe  
testate au prezentate grade diferite de decuplare. Remarcabilă este și acțiunea acidului  
5 picric care a fost asemănătoare cu aceea a 2,4-DNP (fig. 3). Aceste rezultate sunt redată în  
fig. 4.

## 7 **Exemplul 2**

Se procedează ca în exemplul 1, însă materialul biologic utilizat îl constituie drojdia  
9 de bere (*Saccharomyces cerevisiae*). Pentru aceasta se utilizează o suspensie de drojdie  
preparată într-o soluție de glucoză (5 g de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* și 5 g de  
11 glucoză sunt suspendate într-un volum final de 100 mL). Din suspensia proaspăt preparată,  
se relevează 1 mL și se amestecă cu 1 mL de soluție de 2,4-DNP de concentrație 50 μM.  
13 Dispozitivul utilizat, soluțiile de  $K_2Cr_2O_7$   $10^{-2}$  M, NaOH (0,1 N),  $H_2SO_4$  (96%) precum și  
procedeul de lucru sunt identice cu cele descrise în exemplul 1. Singura diferență o constituie  
15 adăugarea, a 1 mL de amestec de suspensie de drojdie cu un volum egal de soluție de 2,4-  
DNP sau aceea unui alt compus chimic ce trebuie investigat.

17 Rezultatele obinute sunt prezentate în fig. 5 în prezența drojdiei de bere, spectrul de  
absorbție al bicromatului de potasiu prezintă aceleași benzi în domeniul ultraviolet ca și în  
19 cazul soluției de  $K_2Cr_2O_7$  pur. 2,4-DNP induce trecerea drojdiei de la respirația aerobă la  
fermentația anaerobă și formare de alcool etilic fapt care permite reducerea ionilor de  $Cr^{6+}$   
21 la ioni  $Cr^{3+}$ , respectiv apariția colorației verzi și dispariția, benzii caracteristice bicromatului  
de potasiu. De asemenea, pe baza acestor date experimentale putem afirma faptul că:  
23 concentrația sau cantitatea de alcool produs este proporțională cu intensitatea acțiunii  
decuplante a fosforilării oxidative. Această afirmație poate fi pusă în evidență pe baza  
25 măsurărilor spectrofotometrice atât în ultraviolet, la aproximativ 350 nm prin diminuarea  
intensității maximului de absorbție, cât și în vizibil, la aproximativ 600 nm, unde creșterea  
27 intensității maximului de absorbție este direct proporțională cu concentrația ionilor de crom  
trivalent formați în prezență de alcool etilic.

# RO 131288 B1

## Revendicări

1. Metodă colorimetrică de determinare a activității agenților decuplanți ai fosforilării oxidative, **caracterizată prin aceea că**, se determină cantitatea de alcool etilic produsă sub acțiunea unor substanțe chimice cum ar fi 2,4-dinitrofenol sau p-nitrobenzalhidei cu ajutorul unei soluții acide de bicromat de potasiu într-un material biologic ce conține celule vii ale unor organisme eucariote. 3 5 7
2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, se folosește drept probă câte 1 g de radicule secționare sau o suspensie de drojdie preparată din drojdie *Saccharomyces cerevisiae* și glucoză, care sunt tratate, timp de 15 min, cu o soluție proaspăt preparată de 2,4- dinitrofenol, cu concentrația 50 μM, proba se menține în soluția de tratament timp de 15 min și apoi menținută la temperatura camerei timp de 30 min, peste radiculele ce conțin etanol se adaugă NaOH 0,1 N, se introduc  $K_2Cr_2O_7$   $10^{-2}$  M și  $H_2SO_4$  96%, vasul se incubează timp de 1 h, la temperatura de 55°C, după captarea vaporilor de alcool etilic și apă în soluția de bicromat de potasiu, întreg volumul de soluție ce conține bicromat de potasiu nereacționat, acid sulfuric, alcool etilic și vapori de apă captați, se aduce la un volum constant cu apă distilată, apoi se determină concentrația sau cantitatea de alcool etilic rezultată sub acțiunea agenților decuplanți prin spectrometrie la lungimi de undă cuprinse în domeniul spectral  $\lambda = 250-650$  nm. 9 11 13 15 17 19

(51) Int.Cl.

G01N 21/31 (2006.01);

G01N 21/72 (2006.01)

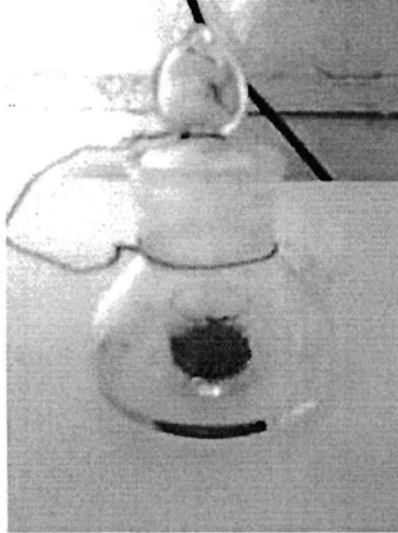


Fig. 1

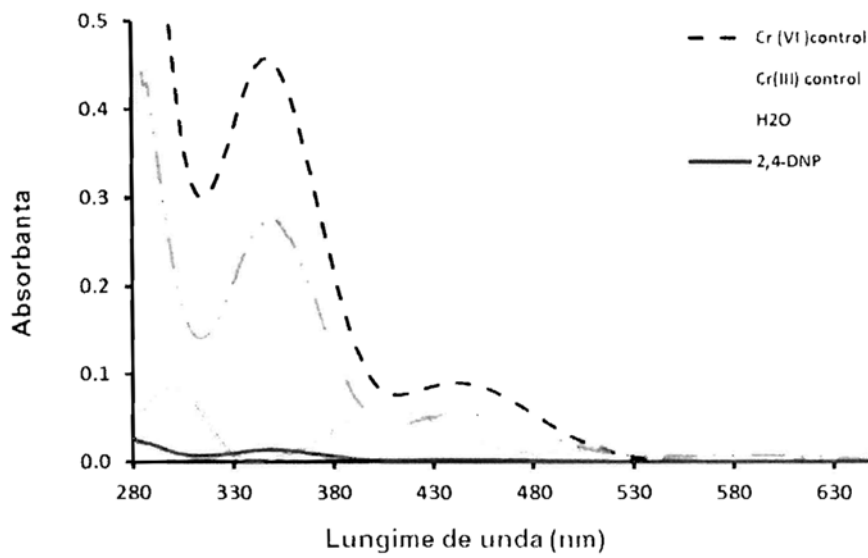


Fig. 2



(51) Int.Cl.

G01N 21/31 (2006.01);

G01N 21/72 (2006.01)

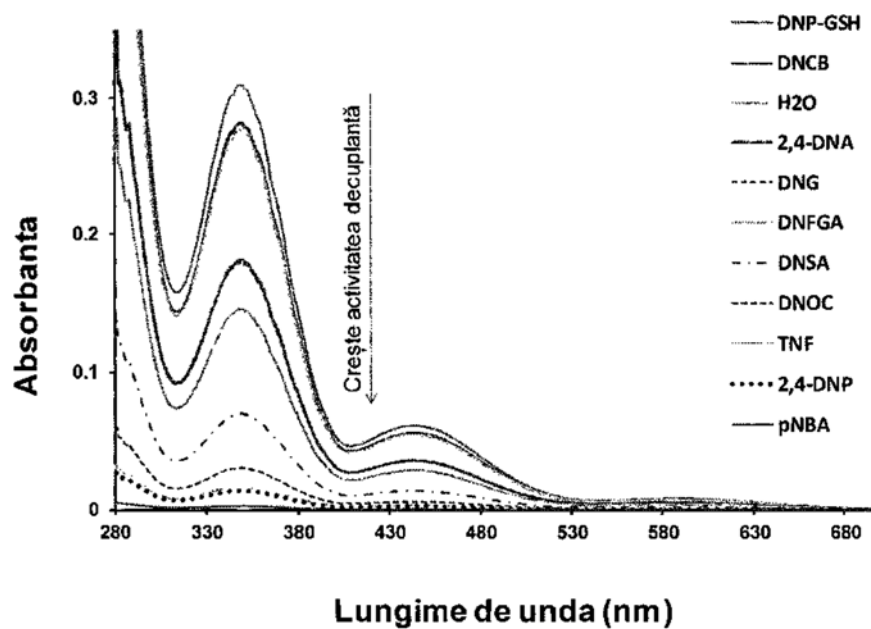


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 21/31 (2006.01),

G01N 21/72 (2006.01)

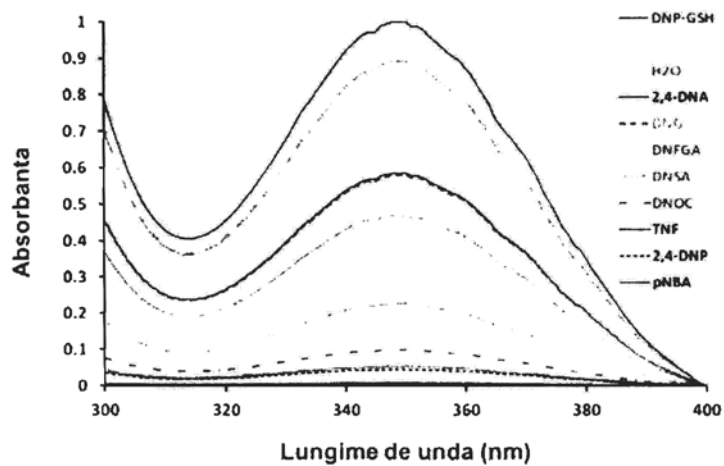


Fig. 4

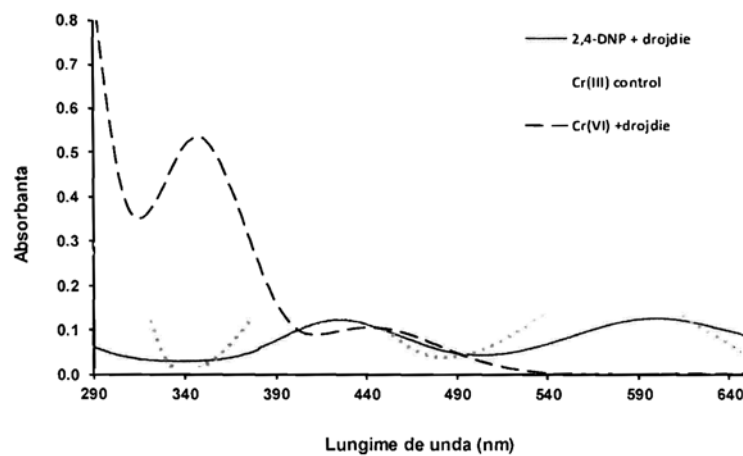


Fig. 5

(51) Int.Cl.

G01N 21/31 (2006.01);

G01N 21/72 (2006.01)

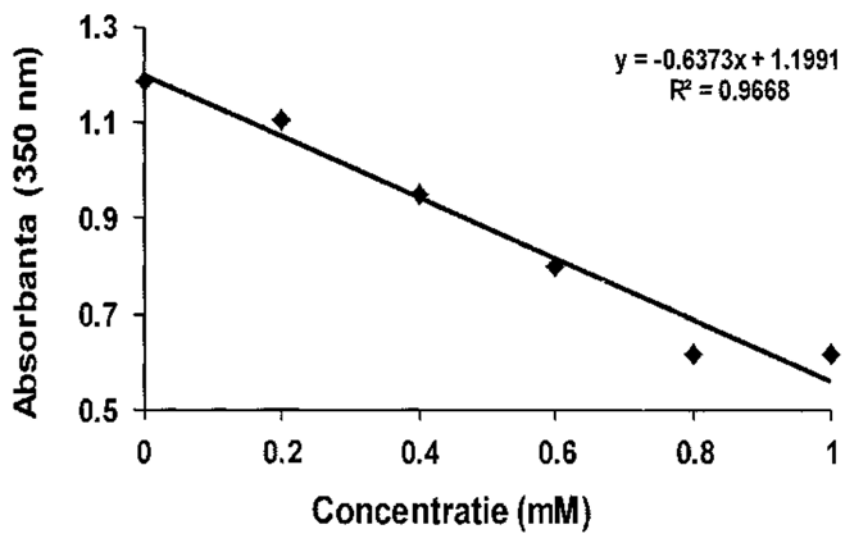


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 396/2023