



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015016064-0 A2



(22) Data do Depósito: 02/07/2015

(43) Data da Publicação: 03/01/2017

(54) Título: COMPOSIÇÃO COSMÉTICA ORAL A BASE DE HIPERICINA E USO DA MESMA

(51) Int. Cl.: A61K 8/97; A61Q 11/00

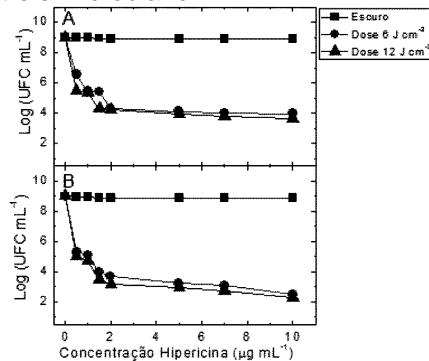
(52) CPC: A61K 8/97, A61Q 11/00, A61K 2800/434

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

(72) Inventor(es): JANICE RODRIGUES PERUSSI; PRISCILA FERNANDA CAMPOS DE MENEZES; LIVIA RODRIGUES PERUSSI VALVERDE; ANDERSON ORZARI RIBEIRO

(74) Procurador(es): MARIA APARECIDA DE SOUZA

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO COSMÉTICA ORAL À BASE DE HIPERICINA E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de uma composição cosmética na forma de enxaguatório bucal. Este enxaguatório bucal é constituído de um composto fotosensível chamado hipericina e é ativado pela luz LED na faixa do visível (400-750nm) realizando, assim, Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Tal composição é utilizada na eliminação dos germes causadores de placa bacteriana, doenças periodontais (gengivite e periodontite), cárries, mau hálito e outros problemas relativos à saúde bucal no controle microbiano.



**"COMPOSIÇÃO COSMÉTICA ORAL À BASE DE HIPERICINA E USO
DA MESMA"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se insere no campo de aplicação da química, farmácia, medicina, mais especificamente, das necessidades humanas, de preparações para finalidades médicas, uma vez que se refere ao desenvolvimento de uma composição cosmética à base de hipericina, ativada pela luz em comprimento de onda específico, que tem por objetivo realizar o controle microbiológico por meio da Terapia Fotodinâmica.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade relativamente nova para o tratamento de câncer e caracteriza-se por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes capazes de absorver a luz do laser e/ou LED (do inglês, low emission diode), em comprimento de onda específico, levando a mecanismos de transferência de energia entre o Fotossensibilizador (FS) e o oxigênio molecular presente nos tecidos, gerando então espécies reativas de oxigênio capazes de levar as células tumorais à morte. Além do tratamento do câncer, outras moléstias tais como infecções bacterianas, fúngicas e virais, que têm como característica comum multiplicação desordenada de células, podem ser tratadas pela terapia fotodinâmica, chamada

nesse caso de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

[3] A TFDa se baseia na combinação de um FS não tóxico com luz visível de comprimento de onda adequado, que na presença do oxigênio é ativado, podendo promover uma resposta foto tóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar biomoléculas e estruturas celulares levando à morte dos microrganismos. Até o momento há dois tipos de mecanismos descritos na literatura que justifiquem o efeito fotodinâmico desta terapia, designados como Tipo I e Tipo II. No mecanismo Tipo I o FS ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres como hidroxila ($\cdot OH$) e superóxido ($\cdot O_2^-$). No mecanismo Tipo II o FS ativado reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singlete ($1O_2$).

[4] Para o controle das infecções bucais, os antibióticos têm sido utilizados de forma indiscriminada na prática clínica causando uma série de problemas como: 1) aumento das infecções causadas por microrganismos multi-resistentes; 2) alteração na composição dos antimicrobianos que se tornam cada vez mais tóxicos para inativar os microrganismos resistentes e acabam afetando as células dos hospedeiros; 3) longos períodos de internação de pacientes com infecções e o aumento nos custos hospitalares e da saúde pública.

[5] O uso indiscriminado dos antimicrobianos provocou o aparecimento de microrganismos resistentes tais como: (i) bactérias Gram-positivas como os enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês vancomycin-resistant enterecocos) e estirpes multi-resistentes de pneumococos; (ii) bactérias Gram-negativas como as produtoras de enzimas que promovem a transferência de agrupamentos químicos conhecidos como betalactamases que clivam anéis betalactâmicos de penicilinas e cefalosporinas e as multi-resistentes como os meningococos com susceptibilidade diminuída à penicilina; (iii) *C. albicans*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros.

Hipericina

[6] A hipericina é um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família Guttiferae, sendo o representante mais comum o *Hypericum perforatum*, uma planta herbácea perene, com folhas amarelas douradas, popularmente conhecida como erva de São João. Essa planta é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas e antivirais. Atualmente a planta não é muito usada para estes propósitos, mas sim, largamente usada para o tratamento da depressão branda. Dos princípios isolados da planta, os mais importantes são a hipericina, pseudo-hipericina, hiperforina, amentoflavonóide, biapigenina e

xantonas. Também estão presentes flavonóides, tais como a rutina, hiperósideos e óleos essenciais.

[7] A hipericina é um FS foto estável de elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete apresentando, portanto, alta atividade fotodinâmica. Possui um intenso espectro de absorção com dois picos principais em 545 e 590 nm, sendo que a banda em 590 nm apresenta elevado coeficiente de extinção molar, este relacionado a seu potencial fotodinâmico.

[8] O recente interesse na molécula de hipericina é o resultado do descobrimento do seu potencial como antiviral, antiretroviral, bactericida, antipsoriático e agente antitumoral. A TFDa com hipericina é promissora visto que a hipericina apresenta elevada atividade fotodinâmica em baixas concentrações. Além disso, pode ser utilizada via oral e não mancha os dentes e compósitos já que a coloração da mesma é amarela translúcida quando administrada em baixas concentrações.

[9] A TFDa com Hipericina pode ser aplicada de forma profilática na prevenção das diferentes doenças bucais bem como no tratamento auxiliar dos procedimentos convencionais aumentando as chances de sucesso no tratamento odontológico.

ESTADO DA TÉCNICA

[10] O pedido de patente EP0117905 refere-se a uma composição na forma de pasta de dente ou enxaguatório bucal que contém, dentre outras substâncias, óleo da erva de São João, planta da qual se extrai a hipericina, para prevenção/tratamento de doenças bucais. Tal pedido não apresenta conflito com a referida invenção já que a mesma

trata-se de uma composição contendo óleo da erva de São João e não a hipericina isolada e em uma composição aquosa. Além disso, o tratamento na forma de enxaguatório bucal e/ou na forma de pasta de dente não está associado à ativação da luz LED para o tratamento fotodinâmico.

[11] Uma composição farmacêutica contendo hipericina (e outros constituintes da erva de São João) foi descrita no pedido de patente DE19950933 para ser utilizada no diagnóstico e/ou tratamento fotodinâmico de desordens malignas e não malignas na região bucal e no cérebro. Tal pedido difere da presente invenção, que tem por objetivo otimizar a Terapia fotodinâmica no tratamento bucal do controle microbiano utilizando para isso a hipericina como agente fotossensibilizante.

[12] O pedido de patente WO2006106996 descreve uma composição oral compreendendo um inibidor do crescimento da célula epitelial gengival para o uso no tratamento de uma doença por via oral, tais como gengivite e periodontite, sendo tal inibidor extraído de um grupo selecionado de plantas, dentre elas a erva de São João. Tal pedido não apresenta conflito com a referida invenção já que a mesma trata-se de uma composição contendo hipericina e outras substâncias para o tratamento das doenças orais como gengivite e periodontite sem ativação da luz LED. Isto é, esta patente não menciona o tratamento fotodinâmico no tratamento das doenças bucais. A presente invenção tem por objetivo otimizar a Terapia fotodinâmica no tratamento bucal no controle microbiano utilizando para isso a hipericina como agente fotossensibilizante.

[13] O pedido de patente RU2369401 refere-se a uma composição que contém dentre outras substâncias, floroglucinóis extraídos da erva de São João para tratamento de doenças da cavidade bucal e das vias respiratórias superiores. Tal pedido difere da presente invenção visto que o mesmo não menciona o tratamento fotodinâmico no tratamento das doenças bucais. A patente em questão tem por objetivo otimizar a Terapia fotodinâmica no tratamento bucal no controle microbiano utilizando para isso a hipericina como agente fotossensibilizante.

[14] O pedido de patente RU2295967 refere-se a um extrato aquoso de diferentes plantas que inclui erva de São João para profilaxia e tratamento da mucosa da cavidade oral e de tecidos periodontais em indivíduos idosos que usam prótese dentária com ação anti-inflamatória, antibacteriana e anti-hemorrágica sem perdas da microflora natural da cavidade bucal. Tal pedido não apresenta conflito com a referida invenção já que o mesmo não menciona o tratamento fotodinâmico no tratamento das doenças bucais. A patente requerida tem por objetivo otimizar a Terapia fotodinâmica no tratamento bucal no controle microbiano utilizando para isso a hipericina como agente fotossensibilizante.

[15] O pedido de patente US 6290496 refere-se a uma escova de dente que apresenta lâmpada de baixa potência capaz de durante o procedimento de escovação atuar no tratamento da doença periodontal e no controle microbiológico. Tal pedido não apresenta conflito com a presente invenção já que o uso pretendido do equipamento de escovação é de uso contínuo atuando no controle

microbiológico através do efeito foto térmico e não através da terapia fotodinâmica. Além disso, o tratamento é realizado utilizando-se uma lâmpada acoplada na escova de dente e não um equipamento à base de LEDs como na patente em questão.

[16] O pedido de patente WO 2006047868 refere-se a um método para tratamento microbiológico da cavidade bucal principalmente da doença periodontal e halitoses através da terapia fotodinâmica utilizando diferentes tipos de fotossensibilizadores e luz não coerente, isto é não laser. Tal pedido não apresenta conflito com a presente invenção já que o mesmo não menciona a hipericina como fotossensibilizador, bem como o modo de uso ou aplicação não é na composição de enxaguatório bucal.

OBJETIVO E VANTAGENS DA INVENÇÃO

[17] A presente invenção tem por objetivo o desenvolvimento de uma composição cosmética contendo hipericina na forma de enxaguatório bucal. Tal composição quando ativada por luz em um comprimento de onda específico, realiza o controle microbiológico por meio da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

[18] A TFDa apresenta vantagens em relação aos antibióticos comumente utilizados nos tratamentos antimicrobianos, destacando-se: largo espectro de ação, visto que o FS pode agir sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários; eficácia, independente das cepas microbianas serem resistentes a antibióticos; possibilidade do desenvolvimento de protocolos que conduzam a uma

extensa redução dos microrganismos com dano muito limitado ao tecido hospedeiro; falta de seleção de cepas fotoresistentes após múltiplos tratamentos; baixa probabilidade de promover mutagenicidade; disponibilidade de formulações que permitam uma pronta e específica liberação do FS na área infectada e uso de uma fonte de luz de baixo custo para a ativação do agente FS.

[19] Além disso, a composição contendo hipericina apresenta várias vantagens relativas à Clorexidina, um dos enxaguatórios bucais mais vendidos no mercado, que quando em uso prolongado leva ao manchamento dos dentes, alteração do paladar e eliminação das bactérias não patogênicas; e apresenta vantagens relativas a outros fotossensibilizadores utilizados em TFD que também levam ao manchamento dos dentes e compósitos já que devem ser aplicados em concentrações elevadas, tornando-se inviáveis comercialmente para a prática clínica odontológica e para o público em geral, consumidores de enxaguatório bucal. Outra vantagem da TFDa com hipericina deve-se ao fato que este tratamento pode minimizar o início e progressão das doenças periodontais, sendo estas as maiores responsáveis pelas perdas dentárias em adultos.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[20] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de uma composição cosmética na forma de enxaguatório bucal. Este enxaguatório bucal é constituído de um composto fotossensível chamado hipericina e é ativado pela luz LED na

faixa do visível (400-750nm) realizando, assim, Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

[21] Tal composição é utilizada na eliminação dos germes causadores de placa bacteriana, doenças periodontais (gengivite e periodontite), cáries, mau hálito e outros problemas relativos à saúde bucal no controle microbiano.

[22] Trata-se, portanto de um antisséptico bucal que quando ativado por luz tem por função atuar no controle microbiológico de bactérias gram positivas e negativas assim como para algumas leveduras.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[23] A Figura 1 representa graficamente a foto inativação de *E. coli* após (A) 5 e (B) 10 minutos de incubação com Hipericina no escuro (sem irradiação) ou seguida de irradiação com 6 e 12 $J \text{ cm}^{-2}$.

[24] A Figura 2 representa graficamente a foto inativação de *S. aureus* após (A) 1,15 min, (B) 2,50 min e (C) 5 minutos de incubação com Hipericina no escuro (sem irradiação) ou seguida de irradiação com 3 e 6 $J \text{ cm}^{-2}$.

[25] A Figura 3 representa graficamente a avaliação do desempenho da Terapia Fotodinâmica com hipericina no preenchimento ósseo durante o tratamento da doença periodontal em ratos. Grupos: Controle (sem tratamento), Grupo RAR (raspagem), Grupo PDT ou TFD (tratamento envolvendo a ativação da hipericina pela luz) e grupo PDT ou TFD e RAR (associação dos dois tratamentos: raspagem e PDT ou TFD com hipericina).

[26] A Figura 4 representa graficamente a acumulação intracelular de hipericina em células de carcinoma de

laringe humana (HEp-2) em função do tempo de incubação a 37 °C no escuro. A hipericina foi extraída com acetona e sua concentração foi normalizada pela concentração de proteína.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[27] A presente invenção resume-se em uma composição cosmética oral à base de hipericina que quando ativada pela luz é capaz de realizar a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Na Tabela 1 pode-se observar a descrição dos componentes da formulação cosmética do enxaguatório bucal.

Tabela 1: Descrição dos componentes da formulação cosmética do enxaguatório bucal.

| Ingrediente /ativo | Faixa de concentração % |
|---|-------------------------|
| Hipericina | 0-20 |
| Emulsionantes poliméricos como: mistura contendo Polioxietileno e Polioxipropileno (Poloxamer) e Mistura contendo Acrilato e C10-30 Alquil Acrilato Crosspolímero (Pemulen TR2 e Pemulen TR1) | 0-12 |
| Emoliente como: Glicerina, propilenoglicol, glicerol, dimeticona, ciclometicona, óleo mineral, esqualano, lactatos | 0-2 |
| Agente sequestrante: EDTA, ácido cítrico | 0,5-0,15 |
| Solubilizante: DMSO | 0-5 |
| Espessantes: manteigas naturais (manteiga de cacau, murumuru, tucumã), ceras animais e vegetais (abelha, candelita e carnaúba), carbomeros (Carbopol), polímeros (poliacrilato de sódio ou carbômero sódico); metacrilato de poliglicerila; poliacrilamida, copolímero de acrilamida (e) parafina (e) | 0,5-0,20 |

| | |
|---|-----------|
| isoparafina (e) polisorbato, Álcoois graxos (Cetílico, Cetoestearílico, Estearílico, Berrênico), silicones. | |
| Conservantes como: propilparabeno, metilparabeno, fenoxietanol, etilparabeno, butilparabeno, álcool benzílico | 0,5-0,15 |
| Edulcorantes como: sorbitol, sacarina sódica | 0-0,5-0,1 |
| Antioxidante da formulação: BHT, vitamina C, vitamina E | 0-0,5-0,2 |
| aroma | 0-0,2 |
| Veículo aquoso: Água destilada | 70-80% |

[28] A porcentagem entre os componentes da formulação resume-se em: 70-80% do veículo aquoso da formulação (água), 0-20% de ativo (hipericina) e em torno de 20% dos outros componentes que compõe a emulsão (antioxidantes, conservantes, emulsionantes, edulcorantes, aromas, solubilizantes e espessantes).

[29] Esta formulação cosmética apresenta elevado potencial de aplicação imediata em terapia fotodinâmica antimicrobiana com elevada viabilidade comercial devido ao seu baixo custo e segurança uma vez que hipericina está presente no extrato da erva de São João disponível para uso em farmácias de todo o Brasil. Além disso, a baixa dose de luz necessária para a obtenção do efeito bactericida desejado é totalmente inofensiva à saúde humana e pode facilmente ser obtida com um dispositivo LED portátil e de fácil uso e baixo custo.

[30] Para comprovar a efetividade da Hipericina realizaram-se diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* em animais.

[31] Em testes *in vitro* realizados em microrganismos observou-se que a hipericina apresenta elevado potencial na redução microbiológica de diferentes bactérias patogênicas como: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, etc., sendo que algumas destas bactérias são encontradas também na cavidade oral.

[32] A Figura 1 mostra que a hipericina na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ provoca uma redução de 7 log no crescimento de *E. coli* após irradiação com dose de luz de 12 J cm^{-2} .

[33] A Figura 2 mostra a fotoinativação da bactéria *S. aureus* com hipericina sendo que na concentração de apenas $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hipericina e irradiação nas doses $3 \text{ e } 6 \text{ J cm}^{-2}$ atinge-se 8 log de redução bacteriana quando se utiliza tempo de incubação de 5 minutos.

[34] Nos testes realizados *in vivo* em animais utilizando hipericina observou-se que a TFDa foi capaz de mostrar resultados histológicos e imunológicos semelhantes ao tratamento mecânico convencional (raspagem) empregado para as doenças periodontais.

[35] Deste modo, a TFD com hipericina impediu a progressão da perda óssea causada pela doença, sendo uma grande vantagem uma vez que é uma técnica menos indolor e invasiva.

[36] De acordo com a Figura 3, o tratamento com PDT ou TFD aumenta o preenchimento ósseo em 15 dias

de tratamento equiparando-se ao tratamento conjugando-se as duas técnicas (TFD e raspagem).

[37] Destes dados podemos concluir que além da hipericina atuar no controle microbiológico, ela também leva à calcificação com consequente preenchimento ósseo da cavidade oral sendo, portanto, mais uma vantagem da aplicação de TFD com hipericina.

[38] A hipericina apresenta a vantagem de não causar danos teciduais à cavidade oral uma vez que a fotoinativação é seletiva, o que pode ser explicado pela rápida acumulação de hipericina nos microrganismos (minutos) comparada à acumulação em células epiteliais (horas). A Figura 4 mostra esta acumulação lenta de hipericina em células epiteliais humanas.

[39] Para o tratamento com a hipericina utilizou-se um protótipo à base de LEDs com comprimento de onda que pode variar na faixa de 400-500nm, de 510-600nm e de 610-680nm com intensidade de iluminação variando de 10-120mW/cm² com doses de iluminação variando de 4-30J/cm² ou de 4 a 60 J/cm² ou de 4 a 90J/cm².

[40] Para o tratamento com o enxaguatório bucal preconiza-se utilizar o produto cosmético de 1-15 min antes da iluminação com um protótipo à base de LEDs na faixa de comprimento de onda de irradiação e intensidade de luz e dose de iluminação conforme descrito acima.

[41] De acordo com os resultados apresentados fica evidente que a hipericina apresenta elevada atividade

antimicrobiana e pode ser aplicada com efetividade garantida em um enxaguatório bucal.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição cosmética oral à base de hipericina **CARACTERIZADA** pelo fato de ser uma formulação de enxaguatório bucal.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender:

- 0 a 20% de hipericina;
- 0 a 12% de emulsionante polimérico;
- 0 a 2% de emoliente;
- 0,5 a 0,15% de agente sequestrante;
- 0 a 5% de solubilizante;
- 0,5 a 0,2% de espessante;
- 0,5 a 0,15% de conservante;
- 0 a 0,5% de edulcorante;
- 0 a 0,5% de antioxidante;
- 0 a 0,2% de aroma;
- 70 a 80% de veículo aquoso.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de o emulsionante polimérico compreender, preferencialmente, mistura contendo polioxietileno e polioxipropileno e mistura contendo acrilato e C10-30 alquil acrilato crosspolímero.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de o emoliente compreender, preferencialmente, glicerina, propilenoglicol, glicerol, dimeticona, ciclometicona, óleo mineral, esqualano ou lactatos.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de o agente sequestrante compreender, preferencialmente, EDTA ou ácido cítrico.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o solubilizante compreender, preferencialmente, o DMSO.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o espessante compreender, preferencialmente, manteigas naturais de cacau, murumuru, ou tucumã; ceras animais e vegetais de abelha, candelita ou carnaúba; carbômeros; poliacrilato de sódio ou carbômero sódico; metacrilato de poliglicerila; poliacrilamida; copolímero de acrilamida (e) parafina (e) isoparafina (e) polisorbato; álcoois cetílico, cetoestearílico, estearílico ou berrênico; ou silicones.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o conservante compreender, preferencialmente, propilparabeno, metilparabeno, fenoxietanol, etilparabeno, butilparabeno ou álcool benzílico.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o edulcorante compreender, preferencialmente, sorbitol ou sacarina sódica.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o antioxidante compreender, preferencialmente, BHT, vitamina C ou vitamina E.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADA pelo fato de o veículo aquoso compreender, preferencialmente, água destilada.

12. Uso da composição cosmética oral à base de hipericina, como definida em qualquer uma das

reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser para o controle microbiológico por meio da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de a terapia fotodinâmica antimicrobiana ser realizada por ativação da hipericina pela luz LED na faixa do visível de 400 a 750nm.

RESUMO

"COMPOSIÇÃO COSMÉTICA ORAL À BASE DE HIPERICINA E USO DA MESMA"

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de uma composição cosmética na forma de enxaguatório bucal. Este enxaguatório bucal é constituído de um composto fotossensível chamado hipericina e é ativado pela luz LED na faixa do visível (400-750nm) realizando, assim, Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Tal composição é utilizada na eliminação dos germes causadores de placa bacteriana, doenças periodontais (gengivite e periodontite), cáries, mau hálito e outros problemas relativos à saúde bucal no controle microbiano.

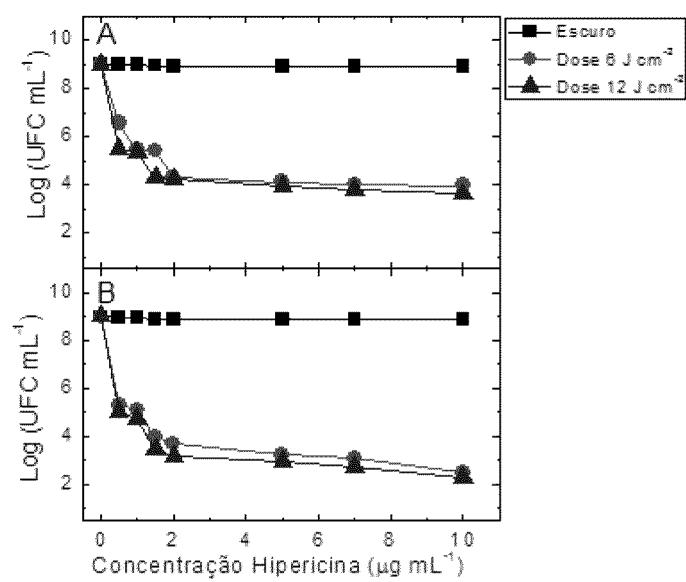


Figura 1

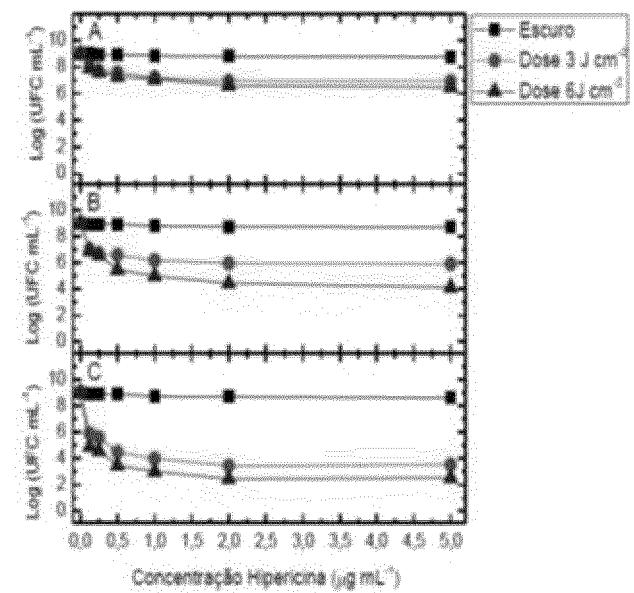
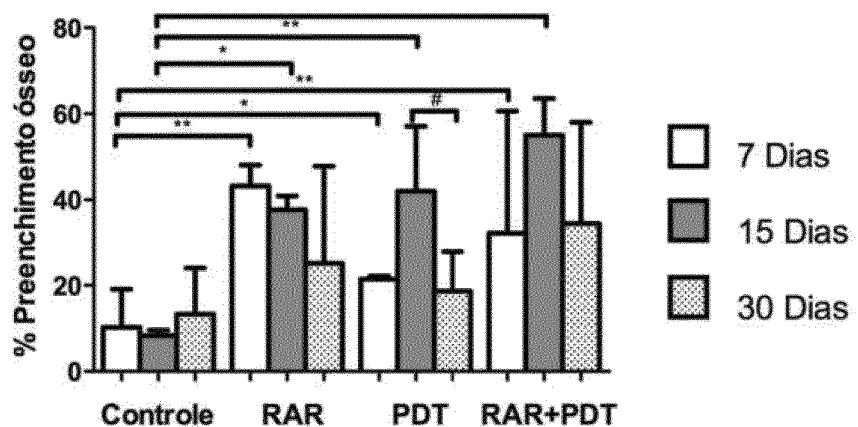


Figura 2



Group I Group II Group III Group IV

Figura 3

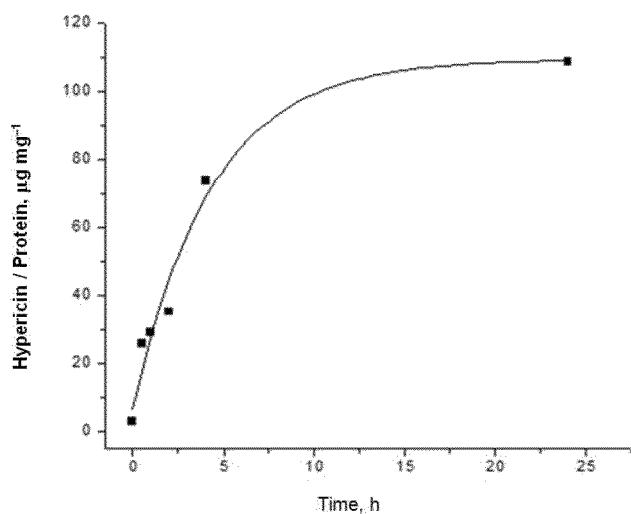


Figura 4