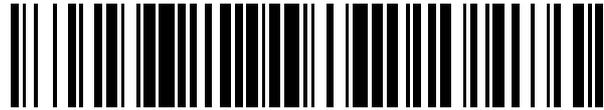


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 339**

51 Int. Cl.:

G01R 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2005 E 05743649 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 1738190**

54 Título: **Método para determinar un factor de protección solar integral que abarca radiación UVA y UVB**

30 Prioridad:

22.04.2004 DE 102004020644

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2013

73 Titular/es:

**COTY B.V. (50.0%)
OUDEWEG 147
2031 CC HAARLEM, NL y
PRIVATINSTITUT FUR DERMATOLOGISCHE
PRODUKTFORSCHUNG GALENUS GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FERRERO, LOUIS;
ZASTROW, LEONHARD;
GOLZ-BERNER, KARIN;
GROTH, NORBERT y
HERRLING, THOMAS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 399 339 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar un factor de protección solar integral que abarca radiación UVA y UVB

5

[0001] La presente invención se refiere a un método para determinar un factor de protección solar integral (Í FPS o FPSi) que abarca tanto radiación UVA como UVB y se puede usar para clasificar pantallas solares cosméticas y dermatológicas.

10

[0002] Se sabe que la radiación UV aumenta considerablemente la producción de radicales libres en la piel. Se producen especies reactivas de oxígeno, tal como el radical hidróxilo $\cdot\text{OH}$, el radical anión superóxido O_2^- y el oxígeno molecular singulete $^1\text{O}_2$, que, a su vez, causan la formación de radicales lipídicos L^* . Por lo tanto, los productos de protección solar cosméticos y dermatológicos contienen sustancias de filtro UV y, además, pequeñas cantidades de antioxidantes.

15

[0003] Además, también se ha confirmado mediante formación de imágenes por resonancia de spin electrónico (ESR) que los rayos UVA y UVB penetran en la piel hasta profundidades diferentes, como se conoce por las actas del 22º congreso IFSCC, Edimburgo 2002, Oral Papers, Vol. 2, Zastrow et al. y otras publicaciones. Los rayos UVB, cuya longitud de onda varía entre 290 y 320 nm, sólo penetran hasta una profundidad de aprox. 50 μm , mientras que la radiación UVA alcanza el estrato de dermis inferior, es decir una profundidad de aprox. 3 mm.

20

[0004] La incidencia de los radicales libres, cuya vida varía entre 0,3 ns ($\cdot\text{OH}$ radical) y varios segundos (L^* radical) y cuya producción en los estratos de piel inferiores se debe principalmente a radiación del rango UVA del espectro solar, se puede medir mediante trampas de spin, tales como DMPO (5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) o PBN (fenil-tert-butilnitrona) y el método ESR.

25

[0005] Herrling et al. investigaron la profundidad de penetración de la radiación UV, preferiblemente la radiación UVA, utilizando trampas de spin y el método ESR (Herrling et al., UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. Free Radical Biology & Medicine (2003), 35, páginas 59 a 67). Así, los autores evaluaron diferentes nitróxidos como nuevas moléculas de trapeado de spin para proporcionar trampas de spin con amplitudes de señal más altas. Los autores, además, observaron que la distribución espacial de la radiación UV inducía radicales como la diferencia de la distribución espacial de los nitróxidos en la piel con o sin radiación UV.

30

[0006] Las pantallas solares comúnmente disponibles tienen factores de protección solar tradicionales (FPSs) o factores de protección ligera ("Lichtschuttfaktoren" - LSFs) que varían de 2 a 100 y preferiblemente entre 4 y 50 en sus etiquetas. La información contenida en ellas se basa en el conocimiento de los usuarios de que pueden exponer su piel a la radiación durante un tiempo mayor, es decir, el tiempo (en minutos) requerido para desarrollar un eritema (quemadura solar) multiplicado por el factor respectivo. Según las conclusiones propias del inventor, no hay correlación lineal entre el enrojecimiento de la piel, que en general debe considerarse como una inflamación (eritema) originada por una cierta dosis de radiación UV y la incidencia de los radicales libres. Por otra parte, las pantallas solares contienen cantidades diferentes de filtros UVA y/o UVB y, por lo tanto, no proporcionan protección adecuada variable y no cuantificable contra los radicales libres en la mayoría de los casos. Los FPSs/LSFs actuales que sólo se relacionan con el efecto de UVB parecen no ser ya adecuados para indicar debidamente el efecto de protección de las pantallas solares.

40

45

[0007] El objetivo de la invención es proporcionar un método para determinar un factor de protección solar integral que abarque el efecto entero de radiación UVA y UVB en la piel y en su profundidad y que pueda servir como un valor guía exacto para los usuarios.

50

[0008] Según la invención, el método para determinar un factor de protección solar integral (ÍFPS) que incluya tanto la radiación UVA como la UVB para pantallas solares dermatológicas y cosméticas incluye los pasos tal y como se definen en las reivindicaciones.

55

[0009] Una cantidad definida de una pantalla solar según la invención es, por ejemplo, una cantidad de 1-4 mg por cm^2 de superficie de piel, ventajosamente 2 mg/cm^2 . Las muestras de piel se usaron y se obtuvieron, por ejemplo, de biopsias de piel, sustratos de piel (piel artificial) o piel de cerdo, preferiblemente fragmentos de piel de las orejas de los cerdos que se tratan ex vivo. Las anteriormente mencionadas muestras de piel se denominarán en adelante "sustratos de piel" o "sustrato". El protector solar se aplica directamente sobre la superficie del sustrato.

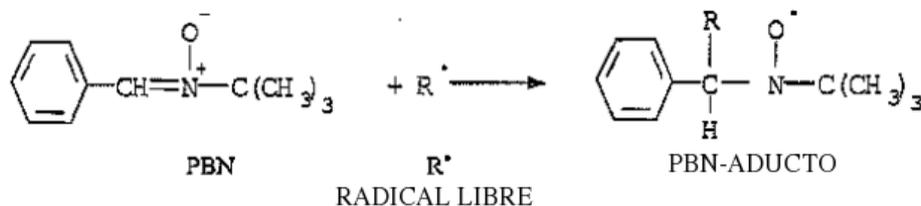
60

[0010] Primero, una trampa de spin, especialmente PBN, se aplica sobre el sustrato, por ejemplo, incubando la muestra para crear un aducto estable, detectable a largo plazo.

65

[0011] La técnica de trapeado de spin se usó para estudiar los radicales libres/ROS (ROS = especies reactivas de oxígeno) generados en las biopsias de piel por exposición a la luz. Esta técnica implica típicamente la adición de un radical libre de vida corta reactivo a través del enlace doble de una "trampa de spin" diamagnética para formar un radical libre mucho más estable, un "aducto radical". La aplicación de trampas de spin prolonga el tiempo de vida (10^{-9}s - 10^{-3}s)

de incluso los radicales libres/ROS más reactivos, como radicales hidróxilos ($\cdot\text{OH}$), radicales anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y radicales lipídicos (L^{\cdot}), por la formación de aductos de trampa de giro (minutos-horas) que se pueden medir por técnicas de ESR. Una trampa de giro preferida es PBN (fenil-tert-butilnitrona) que puede proporcionar una señal de ESR muy estable durante mucho tiempo (aproximadamente 60 min) y por tanto se adapta particularmente para cuantificar los radicales libres generados en la piel después de varias dosis de UV. Este reactivo se adquirió de Sigma Munich Germany. La reacción con PBN se desarrolla de la siguiente manera:



10

[0012] El sustrato se impregna durante, por ejemplo, 30 minutos con la solución de trampa de spin antes de la irradiación UV. La trampa de spin PBN se disuelve en, por ejemplo, una solución de agua/etanol (50/50) dando como resultado una concentración de 400mM.

15

[0013] Posteriormente, la superficie del sustrato se lava, por ejemplo, con agua/etanol y se seca, y la cantidad predeterminada de pantalla solar, por ejemplo, 2mg/cm², se extiende directamente en el sustrato después de un periodo de descanso corto.

20

[0014] El sustrato se deja reposar durante 5-60 minutos, preferiblemente 10-15 minutos y ventajosamente un fragmento de piel cortado del sustrato se expone a radiación de un simulador solar según el paso (b) a 17,53 PM/cm² para el rango UVA y 0,37 PM/cm² para el rango UVB. Los parámetros mencionados aproximadamente corresponden a condiciones de exposición solar naturales. La medición se efectuó después 1-120 minutos mediante espectroscopia ESR.

25

[0015] Una ventaja importante de la espectroscopia ESR con respecto a los métodos ópticos como fluorescencia o quimioluminiscencia es la profundidad de penetración de las ondas electromagnéticas usadas en tejidos biológicos. La longitud de onda de ESR es aproximadamente 10⁵ veces más larga que las otras técnicas, lo que produce una profundidad de penetración de aproximadamente 10 mm en el tejido humano. Una investigación sin interrupciones de la piel entera hasta la dermis inferior es posible. Este rango de medición es muy interesante para detectar el efecto de las radiaciones UV incluso en los estratos más profundos de la piel entera. Esta propiedad predestina la espectroscopia ESR para la evaluación de los factores de protección. No obstante, el cálculo directo de la intensidad de señal de ESR puede llevar a una subestimación del factor de protección si no hay ninguna trampa de spin.

30

[0016] El tiempo entre la exposición a la radiación y la medición depende de la vida limitada del aducto formado por la trampa de spin y el radical libre. Ventajosamente, es de 1-90 minutos.

35

[0017] La ventaja de la trampa de giro PBN es la alta estabilidad del aducto, que permite el análisis cuantitativo, y la alta respuesta de señal que resulta de la no selectividad entre diferentes tipos de radicales retenidos como radicales centrados en hidróxilo o carbono. La forma de señal es la misma para todos los radicales libres retenidos, alcanzando una intensidad de valor máximo más alto.

40

[0018] La cuantificación de los radicales libres generados se realizó por la amplitud de señal pico a pico del aducto de PBN (pico de campo bajo). La amplitud de señal se normalizó en la amplitud de una muestra de calibración (estándar) con un número conocido de radicales libres. Esta estandarización es la base para el cálculo del valor de GR (valor de generación de radicales = RGV, por su sigla en inglés). El RGV describe el número de radicales libres retenidos y se presenta como un número real X multiplicado por 10¹² normalizado para 1mg de la muestra investigada (piel), se refiere a un elemento de volumen de 1 mm · 1 mm · 1 mm con la suposición de una densidad 1 para piel humana y un espesor de aproximadamente 1 mm.

45

[0019] Se simulan varias concentraciones de pantallas solares para valoración y calibración del método de la invención mediante la disposición de filtros reductores de radiación estándar entre la fuente de radiación que emite una cantidad definida de radiación y el sustrato de piel.

50

[0020] Los filtros reductores de radiación preferidos usados son filtros de densidad neutral con factores de reducción de 1, 2, 5, 10 y 20 (Lot Oriel, Francia). Los filtros de densidad neutral están compuestos por sustratos de sílice fundidos en los que se realiza un depósito vacío de un estrato fino de un metal. El espesor del recubrimiento determina la densidad óptica. La absorbancia es casi independiente de la longitud de onda en la banda UV (290-400 nm) e independiente del modo de aplicación propia de estándares cosméticos.

55

[0021] Todas las pantallas solares conocidas (filtros UV) se pueden medir con el presente método, por ejemplo, derivados de ácido 4-aminobenzóico, ésteres de ácido cinámico, derivados de alcánfor benzilideno, derivados de benzofenono, derivados de metoxibenzoil metano, etc. Estas pantallas solares incluyen, por ejemplo, benzofenona-3, benzofenona-4, octil metoxicinamato, homosalato, fenilbenzimidazola ácido sulfónico, metoxicinamato de etilhexilo, isoamil p-metoxicinamato, etilhexil triazona, dietilhexil butamido triazona, 4-metilbencilideno alcánfor, PABA, Etilhexil dimetil PABA, etc. También se pueden medir filtros físicos tales como TiO_2 , ZnO , ZrO_2 , etc. Por ejemplo, los siguientes filtros UV con sus abreviaturas se midieron según el método de la presente invención. ES = etilhexilsalicilato; OC = octocrileno; IMC = p-metoxicinamato de isoamil; BMDBM = metoxidibenzoilmetano de butilo; MBBT = metileno bis-benzotriazoil tetrametilbutilfenol (suministrado como una dispersión acuosa al 50 %). Éste se suministra bajo el nombre comercial de "Tinosorb M". BEMT = bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina. Éste se suministra bajo el nombre comercial de "Tinosorb S".

[0022] Se llevaron a cabo espectros de absorción de UV de diferentes pantallas solares con un analizador de transmitancia Labsphere UV 1000 S, a través de un método espectroscópico descrito en *Cosmetics and Toiletries*, Vol. 118, n° 10, October 2003). Se extendieron muestras de pantallas solares en una placa de PMMA endurecida transparente en $1,2 \text{ mg cm}^{-2}$. El FPS(s) *in vivo* se determinó según el método de prueba de factor de protección solar COLIPA (SPF Test Method. Colipa Ref: 94/289 (1994)). Los factores de protección UVA *in vivo* se determinaron usando el oscurecimiento de pigmento persistente (PPD, por su sigla en inglés) como el punto final (*Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 16, 245-249 (2000)).

[0023] El método según la invención es el primero que tiene en cuenta que el origen de cualquier daño en la piel relacionado con la acción de UV totales es el número total de radicales libres producidos. Este número depende de la dosis de UV total más que de la intensidad de los rayos UV. El número total de radicales libres producidos se puede medir precisamente mediante ESR, y un FPS integrado se puede determinar, lo que proporciona al usuario la información exacta del grado real de protección contra UV.

[0024] Tal FPS se integra en dos sentidos: éste abarca el espectro de UV entero así como la profundidad completa hasta la que la piel se puede dañar por radiación UV.

[0025] Otra ventaja consiste en que el FPSi (FPSi o \int FPS) se puede medir con la misma o incluso aumentada fiabilidad utilizando de 2 a 4 piezas de pliegues de piel de 1 cm^2 cada una y obtenida de cirugía de piel humana o sustratos de piel (piel artificial) o directamente de la piel de cerdo, en vez de medir la aparición de un eritema de una piel de persona de prueba tras una exposición a la radiación cuestionable desde el punto de vista ético. De esta manera, no habrá ningún daño inducido por radiación para la piel de las personas de prueba ya que el nuevo método de medición no requiere personas de prueba. Según la norma COLIPA, se necesitan de 10 a 20 voluntarios. Además, se evitan las consecuencias de los largos tiempos de espera antes de recibir los resultados y no hay necesidad de definir los estándares determinados que se requieren como referencia para la evaluación en los métodos conocidos.

[0026] El nuevo método reduce considerablemente los costes tanto desde un punto de vista de equipamiento como de metodológica, ya actualmente, una medición RGV supone sólo entre la mitad y un tercio de los costes incurridos por los métodos tradicionales para determinar el FPSs.

[0027] Además, el FPSi (FPSi o \int FPS) se puede medir y calcular con una exactitud de aprox. $\pm 10\%$, mientras que la exactitud del método de medición de FPS tradicional, es decir COLIPA (protección UVB), es de sólo $\pm 20-25\%$, o incluso 30-50% para FPSs altos medidos en diferentes institutos de ensayos.

[0028] Ya hoy, el método PPD es más bien impreciso y complicado cuando se usa para tipos de piel oscura, es decir, las mejoras en este aspecto ampliarán el rango de métodos disponibles y conducirán a resultados más fiables. El método de la presente invención es independiente del tipo de piel e independiente del color étnico de la piel.

[0029] Otra ventaja del método según la invención consiste en que se necesita menos equipamiento complejo. Los sistemas de lámpara de gran superficie para exponer grandes superficies de piel a la radiación UV se pueden sustituir por unidades de radiación más pequeñas, más potentes y en forma de punta.

[0030] La medición de radicales libres generados durante la irradiación de UV de las biopsias de piel se realizó con resonancia de spin electrónico (ESR) usando un espectrómetro de banda X de ESR alineado. El espectrómetro fue un ERS 300+ (ZWG Alemania y modificado por Galenus Alemania) con los siguientes ajustes de espectrómetro: frecuencia de microondas $f_0 = 9,52 \text{ GHz}$, potencia de microondas $P_\mu = 20 \text{ mW}$, frecuencia de modulación $f_m = 100 \text{ kHz}$, amplitud de modulación $B_m = 0,2 \text{ mT}$, exploración de campo magnético $\Delta B_s = 20 \text{ mT}$, tiempo de exploración $t_s = 60 \text{ s}$.

[0031] Posiblemente también son utilizables los siguientes ajustes de espectrómetro: potencia de microondas P_μ 10-100mW, amplitud de modulación B_m 0,05- 0,5 mT, exploración de campo magnético ΔB_s 5-20mT, tiempo de exploración t_s 10-120s.

[0032] El producto cosmético o farmacéutico que se va a medir puede también incorporar todas las moléculas antioxidantes o moléculas depuradoras de radicales libres conocidas en el estado de la técnica. Tales sustancias

5 incluyen vitaminas tales como vitamina C y derivados de la misma, por ejemplo, acetato de ascorbil, fosfato de ascorbil y palmitato de ascorbil; vitamina A y derivados de la misma; ácido fólico y derivados del mismo; vitamina E y derivados de la misma, tal como acetato de tocoferilo; superoxidodismutasa; flavonas o flavonoides; aminoácidos, tales como histidina, glicina, tirosina, triptófano y derivados de los mismos; carotenoides y carotenos tales como, por ejemplo, α -caroteno, β -caroteno; ácido úrico y derivados de los mismos; α -hidroxi ácidos tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico; estilbeno y derivados del mismo, etc.

10 [0033] Otro antioxidante preferido para la preparación que se va a medir es una sustancia activa con un alto factor de protección radical que incluye un producto obtenido por extracción de la corteza de Quebracho blanco y la posterior hidrólisis enzimática, que contiene al menos 90 por ciento en peso de oligómeros de proantocianidina y hasta el 10 por ciento en peso de ácido gálico, enlazado a microcápsulas, además un extracto del gusano de seda obtenido por extracción, que contiene la cecropina peptídica, aminoácidos y una mezcla vitamínica; además un hidrogel o mezcla de hidrogeles aniónico, catiónico, o no iónico, además uno o más fosfolípidos y agua. También la preparación compleja puede contener un producto de descomposición de ultrasonido de una levadura que contiene al menos 150 unidades de superóxido-dismutasa por ml y una o más ciclodextrinas. La preparación compleja puede ser un producto según el ejemplo 1 o 2 de la WO99/66881 o el ejemplo 1 de la WO 01/26617. También se prefiere un complejo activo de extractos de planta en solución alcohólica como antioxidante. El complejo comprende 0,1-2 % en peso de extracto de granos de café verdes, 0,1- 2 % en peso de extracto de hojas de *Camellia sinensis*, 0,1-2 % en peso de extracto de *Pongamia pinnata* y 0,1-2 % en peso de extracto de raíz de *Angelica archangelica* al igual que un monovalente alcohol C₂-C₅ para componer el 100 %.

[0034] La invención se detallará más en los siguientes ejemplos. En los dibujos anexos:

25 Fig. 1: representación esquemática de evaluación de factor de protección
 Fig. 2: datos de GR ($X \times 10^{12}$ de la Tabla I) contra dosis de UV
 Fig. 3: relación lineal entre log (dosis UV) y log (generación de radicales libres), según a datos de la figura 2
 Fig. 4: espectro UV de pantallas solares E, N, G y H.

30 RESULTADOS EXPERIMENTALES:

Relación entre dosis de UV y generación de radicales libres (GR)

35 [0035] Se realizó un suministro de diferentes intensidades de irradiación para las biopsias de piel mediante una fuente de UV no filtrada (factor de atenuación de 1) y una fuente de UV filtrada por filtros de densidad neutral con factores de atenuación de 2, 5, 10 y 20. Están colocados entre la fuente de UV y la biopsia de piel, justo en la apertura del soporte de muestra. Los filtros de densidad neutral atenúan los rayos de todas las longitudes de onda por un mismo factor. Se usaron cinco tiempos diferentes de irradiación: 30, 60, 150, 300 y 600 segundos. Con la fuente de UV no atenuada, esto corresponde a aproximadamente 1,7, 3,5, 8,7, 17,4 y 34,8 minutos de exposición al sol natural. Esto también corresponde a 0,11, 0,21, 0,54, 1,07 y 2,14 MED.

40 [0036] Primero se ha comprobado si la ley de reciprocidad se respeta bien. Esto pretende demostrar que el nivel de radicales libres generados sólo depende de la dosis y no del tiempo de aplicación. Este es otro prerrequisito para calcular los factores de protección realistas.

45 [0037] Se eligieron tiempos de irradiación para conseguir una progresión de dosis vinculada con las atenuaciones de filtro de densidad neutral. Por ejemplo, el ensayo de atenuación 2 se puede conseguir con 2 veces más de duración de exposición ($t = 60$ segundos) que el ensayo de atenuación 1 ($t = 30$ segundos). Así, se podría suministrar una misma dosis de UV usando tiempos de irradiación diferentes.

50 [0038] Esto se muestra en la tabla 1, donde se proporciona la cantidad medida de radicales libres inducidos de UV (GR = $X \times 10^{12}$ radicales / mg); según los tiempos de exposición diferentes y las varias atenuaciones ópticas. Se calcularon dosis de UV (mJ / cm^2) (no proporcionadas en la tabla 1) a través de la ecuación (6):

$$Dosis \text{ de UV} = \frac{I \cdot t}{Att} \quad (6)$$

55 I = irradiación de simulador solar (mW / cm^2); t = tiempo(s) de exposición; Att = atenuación de filtro de densidad neutral

60 [0039] Una dosis de UV constante ($537 mJ/cm^2$) podría conseguirse a lo largo de la diagonal (desde la parte superior izquierda a la parte inferior derecha) de la tabla 1, según los 5 tiempos de irradiación: 30, 60, 150, 300 y 600 segundos y los 5 factores de atenuación: 1, 2, 5, 10 y 20. Una cantidad igual de radicales libres se debería medir si la ley de reciprocidad es válida.

[0040] Esto se puede observar con una generación de radicales cuasi constante a lo largo de este rango de tiempo entero: GR media = $1,36 \cdot 10^{12}$ radicales/mg de biopsia de piel con una desviación típica relativa baja: sólo 7,03 % para estos 5 valores.

5 [0041] Otros valores de GR constantes correspondientes a dosis de UV diferentes repetidas se pueden encontrar también en algunas pequeñas diagonales de la tabla 1. Éstas se identifican por sombras/puntos específicos.

[0042] Así, la tabla 1 confirma que la ley de reciprocidad se convalida bien en un rango grande de dosis de UV.

10 Tabla 1: Valores de GR medidos en biopsias de piel ($X \cdot 10^{12}$ rad/mg) según las diferentes atenuaciones de filtro y los diferentes tiempos de irradiación.

TIEMPO(S) DE IRRADIACIÓN	ATENUACIÓN DE FILTRO DE UV NEUTRAL				
	1	2	5	10	20
30	1.34	0.85	0.53	0.31	0.31
60	1.32	1.29	0.79	0.54	0.4
150	2.1	1.99	1.26	0.93	0.67
300	3.48	2.96	1.92	1.40	1.02
600	4.07	3.78	2.46	2.07	1.50

15 [0043] En segundo lugar, la relación entre la dosis de UV y la generación de radicales (GR) ha sido estudiada.

[0044] Con 4 filtros de densidad neutral y la fuente de UV no filtrada, multiplicado por los 5 tiempos de irradiación diferentes, 25 exposiciones a UV diferentes podrían suministrarse, correspondientes a 13 dosis de UV diferentes (ver tabla 1).

20 [0045] La generación de radicales libres en la piel según la dosis de UV se traza en el gráfico de la figura 2. A pesar de los diferentes tiempos de exposición, podemos resaltar que todas las parcelas de datos experimentales individuales están bien agrupados y dispuestas alrededor de una única curva. Las parcelas se pueden conectar según una relación no lineal, sea cual sea el tiempo de exposición que se considere. Esto es obviamente la consecuencia de la ley de reciprocidad. La generación de radicales libres contra la dosis de UV muestra una saturación para las dosis altas de UV.

25 [0046] No obstante, una simple función lineal podría superponerse a las parcelas experimentales cuando se adoptó una escala de logaritmo doble, permitiendo calibrar muy fácilmente el método. Tal representación se muestra en el gráfico de la figura 3, en el que se representó la dosis de UV log contra el GR log. En el presente estudio, el número real X de los datos de GR se multiplicó por un factor 1000, para evitar los datos negativos mediante la transformación de función de logaritmo.

30 [0047] La siguiente función lineal consigue una buena correlación con los datos experimentales, según un simple ajuste numérico de parámetros a y b a través del método de error cuadrático mínimo:

35
$$\log(\text{Dosis UV}) = a \cdot \log(1000 \cdot X) + b \quad (2b)$$

[0048] Esta relación (inversa a la primera relación de la figura 3) permite calcular una dosis de UV relacionada con una cantidad detectada de radical libre (GR) en una biopsia de piel sobre la que se ha extendido un producto de pantalla solar.

Determinación de factores de protección

5 [0049] Los anteriores resultados experimentales permitieron desarrollar un método para la determinación de factores de protección. Estos se calculan como proporción de dosis de UV, como se utiliza generalmente. El método se describe esquemáticamente en la figura 1 con:

- 10 - E_0 es la dosis de UV suministrada a la capa / biopsia de piel protectora del sistema.
- E es la dosis de UV obtenida a través de la ecuación calibrada 2, a partir del número X de radicales libres medido por espectroscopia ESR. Esta dosis de UV "efectiva" debería suministrarse a unas biopsias no protegidas para dar la misma cantidad de radicales libres medidos en las biopsias protegidas, en las que se extendió un estrato de pantalla solar de 2 mg / cm^2 .

15 La tabla 2 contiene factores de protección basados en este método con datos recibidos de la tabla 1 y con valores paramétricos de la ecuación 2 proporcionados en la figura 3. Estos se comparan con los valores de atenuación de filtro de densidad neutral que sirvieron como referencias. Cada factor de protección calculado es el promedio de 5 valores correspondientes a los diferentes tiempos de irradiación. La atenuación de filtros neutrales y los factores de protección calculados están muy cerca.

20 Tabla 2: cálculo de factores de protección de filtros de densidad neutral, a partir de datos de GR proporcionado en la tabla 1.

Atenuación de filtro neutral	1	2	5	10	20
Factor de protección calculado	1,33	2,23	5,54	9,86	18,40
Desviación estándar	0,42	0,2	0,61	1,78	2,38

25 El FPS integrado:

[0050] La relación documentada anterior entre dosis de UV y valor de GR permite calcular los factores de protección de una manera similar al FPS *in vivo*. La validez de estos nuevos factores de protección ha sido controlada usando filtros de densidad neutral como estratos de protección estándar.

30 [0051] Por lo tanto, usando la misma metodología que en la determinación del FPS *in vivo*, con:

Definición:
$$\text{FPS} = \frac{\text{MED}_p}{\text{MED}_n}$$
 para punto final de eritema.

Donde MED_p = dosis de UV eritemal mínima suministrada para proteger la piel

35 MED_u = dosis de UV eritemal mínima suministrada a piel desprotegida (en blanco).

[0052] Según la descripción esquemática (Figura 1), MED_p y MED_u corresponden ahora a E_0 y E cuando el punto final de eritema se sustituye por la cantidad de GR de radical libre detectada por espectroscopia ESR.

40 [0053] La medición cuantitativa de radicales libres mediante espectroscopia de banda X ESR, permite determinar un nuevo factor de protección solar. Mientras, una profundidad de penetración superior de espectroscopia ESR permite una investigación completa de la piel, cubriendo todo el rango de UVB y UVA, al igual que la vertical de la piel desde la superficie hasta el subcutis. Con esto, proponemos llamar a este nuevo indicio de protección Factor de Protección Solar Integrado (FPSi, FPSi o FPS).

45 La determinación del FPS:

[0054] La principal vía se ha mostrado en la figura 1. Se han realizado los siguientes pasos:

50 1) La relación numérica entre dosis de UV y generación de radicales libres (GR) se ha establecido (evaluación de los parámetros a y b de la ecuación 2). Ambos parámetros de ecuación deberían ajustarse (calibrarse) de vez en cuando midiendo la generación de radicales libres en biopsias no protegidas sometidas a diferentes dosis de UV.

55 2) Las biopsias protegidas (2 mg / cm^2 de una extensión de producto de pantalla solar en la superficie de la epidermis) se irradian. La generación de radicales libres se evalúa por espectroscopia ESR para cada tiempo de exposición (t). Por lo tanto, el valor de GR de la biopsia protegida = X_t (medido).

3) La dosis de UV correspondiente suministrada a la biopsia protegida (E_0)_t se calcula para cada tiempo de exposición con:

$$(E_0)_t = \text{Irradiación} \cdot \text{tiempo.} \quad (3)$$

4) La dosis de UV eficaz (E_t) requerida para generar la misma cantidad X_t de radicales libres se calcula, según los parámetros a y b de la ecuación 2:

$$\log_{10} (E)_t = a \cdot \log_{10} (X_t \cdot 1000) + b \quad (2a)$$

5) El FPS integrado del producto de pantalla solar se calcula como proporción de dosis de UV para un mismo tiempo de exposición:

$$FPS = \frac{(E_0)_t}{(E)_t} \quad (1a)$$

Ejemplos 1 y 2

[0055] Se evaluaron dos muestras de pantalla solar diferentes, ambas alcanzaron una alta protección en UVB y niveles de protección de UVA diferentes: la pantalla solar A es una pantalla solar física TiO_2 , con un FPS de 26 y un FP de UVA (PPD) = 5; la pantalla solar B es una pantalla solar de filtro de UV orgánico, con un FPS = 39 y un FP de UVA (PPD) = 12.

[0056] Ambos productos se aplicaron en la superficie de la piel a 2 mg/cm^2 y se evaluaron según 3 tiempos de irradiación. Las biopsias de piel no cubiertas también se evaluaron en paralelo, un conjunto directamente expuesto al simulador solar y un segundo conjunto expuesto a través de un filtro de densidad neutral con atenuación 30. Cada uno de los datos de generación de radicales libres, proporcionados en la tabla 3, se calculó según el promedio de las 4 biopsias.

Tabla 3: generación de radicales libres según tiempos de irradiación diferentes ($GR = X \cdot 10^{12} \text{ rad/mg}$).

Tiempo de exposición (segundos)	X blanco sin atenuación	X atenuación de filtro neutral 30	X pantalla solar A	X pantalla solar B
60 s	1,82	0,34	0,62	0,48
120 s	2,36	0,49	0,84	0,66
180 s	2,82	0,54	0,98	0,75

[0057] En una primera fase, la relación entre generación de radicales libres ($X_t \cdot 1000$) y dosis de UV se estableció de nuevo para probar su reproductibilidad. Se usaron biopsias de piel no cubiertas, sin y con el filtro de densidad neutral. Las dosis de UV que recibieron estas biopsias de piel se calculó según la ecuación (6).

[0058] Si los datos de calibración se fijan en un gráfico de logarítmico doble de eje XY uno recibe los parámetros de ecuación (2) precisos según la siguiente ecuación (5):

$$\text{Log (Dosis UV)} = 2,0947 \cdot \text{Log} (1000 \cdot X) - 3,7463 \quad (5)$$

[0059] Se puede observar que la ecuación (5) está muy cerca de la relación lineal presentada en la figura 3.

[0060] Todos los datos de tabla 3 se transformaron a través de una función de logaritmo (base 10) para obtener una relación lineal:

Tabla 3a

Columna 2		Columna 3	
Log (1000*Generación de radicales) Blanco	Log (Dosis UV) Blanco	Log (1000* Generación de radicales) Atenuación 30	Log (1000* Generación de radicales) Atenuación 30
3,26007139	3,03100428	2,53147892	1,55388303
3,372912	3,333203428	2,69019608	1,85491302
3,45024911	3,50812554	2,73239376	2,03100428

ES 2 399 339 T3

[0061] Después log (Radical) vs log (dosis de UV) es correlacionado a través de la ecuación 2:

Tabla 3b ajuste de parámetros a y b

LOG 1000*FGR	LOG DOSIS UV	LOG DOSIS UV CALC. (ecuación 1)	CUADRADO de LOG DIFERENCIA DOSIS = Delta ²
3,26007	3,03100	LogE1=a*3,26007-b	=((3,03100-LogE1/3,03100) ²
3,37291	3,33203	LogE2=a*3,37291-b	=((3,33203-LogE2)/ 3,33203) ²
3,45025	3,50812		
2,53148	1,55388		
2,69019	1,85491		
2,73239	2,03100		
TOTAL Diferencia cuadrada			= Suma Delta ²

5

[0062] Entonces se determinaron los valores a y b para minimizar la diferencia total cuadrada Delta². Así la ecuación 2 se ajusta bien a los valores experimental con a = 2,0947 y b = 3,7463. Después de ajustarse, la ecuación 2 se utiliza para encontrar Log E según diferentes valores X.

10

[0063] Las dosis de UV se pueden calcular a partir de los datos de generación de radicales de la tabla 3. Estos se proporcionan en la tabla 4. El método de cálculo se comprobó primero comparando las dosis de UV calculadas para dosis de UV suministradas para el filtro neutral y en blanco 30. Sólo se observaron pequeñas diferencias, con una desviación máxima de 13%. En segundo lugar, las dosis de UV eficaces se calcularon para productos de pantalla solar A y B. Estas dosis de UV deberían suministrarse a biopsias no protegidas para dar la misma cantidad de radicales libres medidos en biopsias protegidas, sobre las que se extendió un estrato de pantalla solar de un 2 mg/cm².

15

Tabla 4: dosis de UV calculada (mJ/cm²) de la ecuación (5), según los datos de generación de radicales de la tabla 3

Tiempo (segundos)	Dosis UV suministrada	Banco dosis calculada	Atenuación dosis calculada 30	Dosis calculada pantalla solar A	Dosis calculada pantalla solar B
60 s	1074	1209,16	36,00	126,72	74,13
120 s	2148	2083,77	77,41	239,39	144,45
180 s	3222	3025,83	94,88	330,63	188,81

20

[0064] Según las dosis de UV de la tabla 4, los factores de protección (FPS) se calculan como proporción de dosis de UV, suministrados calculados (efectivos) para un mismo tiempo de exposición (ecuación 1). Los resultados se proporcionan en la tabla 5. La exactitud de los índices se controla con el ensayo de filtro neutral y en blanco 30. Los factores de protección de las nuevas pantallas solares se proporcionan en las columnas 4 y 5 de la misma tabla.

25

[0065] Se calculó la incertidumbre (± 95 % intervalo de confianza) según todas las mediciones (4 biopsias para cada tiempo de exposición).

Tabla 5: índices de protección solar calculados FPS, basados en la proporción de dosis de UV proporcionadas en la tabla 4.

30

FPS

Tiempo (segundos)	Blanco sin atenuación	Atenuación de filtro neutral 30	Pantalla solar A FPS 26 / PPD 5	Pantalla solar B FPS 39 / PPD 12
60 s	0,89	29,83	8,48	14,49
120 s	1,03	27,75	8,97	14,87
180 s	1,06	33,96	9,75	17,07

Promedio	0,99	30,51	9,06	15,47
± 95 % CI	±0,10	± 7,23	± 1,13	± 2,82

[0066] Como una primera observación, se puede destacar que el FPS integrado aumenta con la amplitud de filtración de UV. El valor más alto corresponde a las pantallas solares B que tiene el mejor UVA *in vivo* (PPD). En ambas muestras evaluadas, el FPS integrado es claramente inferior al FPS eritemal *in vivo*.

5

Ejemplos 3-8

[0067] Para determinar la selectividad del FPS integrado para diferentes amplitudes de filtración de UV, se llevaron a cabo formulaciones de pantalla solar especiales, con diferentes filtros de anchos de banda UVA/B y / o de UVB.

10

Ejemplo 3 = pantalla solar C = Base de O-W sin filtro UV

Ejemplo 4 = pantalla solar D = Base + filtro UV 1 (5 % IMC)

Ejemplo 5 = pantalla solar E = Base + filtro UV 2 (10 % IMC)

15

Ejemplo 6 = pantalla solar F = Base + filtro de ancho de banda UVA/UVB 1 (1,5 % BMDBM + 3 % MBBT)

Ejemplo 7 = pantalla solar G = Base + filtro de ancho de banda UVA/UVB 2 (3 % BMDBM + 8 % MBBT + 2 % BEMT)

Ejemplo 8 = pantalla solar H = Base + filtro UV 1 (5 % IMC) + filtro de ancho de banda filtro UVA/UVB 2 (3 % BMDBM + 8 % MBBT + 2 % BEMT)

20

[0068] Las seis muestras de pantalla solar fueron evaluadas como se describe, con 3 tiempos de irradiación diferentes: 30, 60 y 150 s.

25

[0069] Cada uno de los datos de generación radical X, proporcionados en la tabla 6, es el promedio de 4 mediciones de biopsia.

[0070] Los \int FPS (FPS integrados) se calculan como proporción de dosis de UV suministradas para dosis de UV eficaces para un mismo tiempo de exposición (ecuación 1). Cada \int FPS proporcionado es el promedio de 3 cálculos correspondientes a los diferentes tiempos de irradiación. La incertidumbre (\pm 95 % intervalo de confianza) también se calculó y proporcionó en la tabla 6.

30

Tabla 6: datos de GR según tiempos de irradiación diferentes ($GR = X \cdot 10^{12}$ rad/mg).
Un \int FPS medio se calcula a partir de los tres tiempos de exposición diferente.

Tiempo de exposición	Blanco	Pantalla solar C	Pantalla solar D	Pantalla solar E	Pantalla solar F	Pantalla solar G	Pantalla solar H
		Sin filtro UV	UVB 1	UVB 2	UVA/UVB 1	UVA/UVB 2	UVB 1 + UVA/UVB
			FPS 7,6	FPS 11,2	FPS 4	FPS 12,8	21,4
					PPD 5,2	PPD 8,2	PPD 8,6
30 s	1,29	1,26	1,19	1,06	0,52	0,41	0,4
60 s	1,79	1,73	1,48	1,34	0,77	0,57	0,54
150 s	2,73	2,70	2,36	2,28	1,19	0,79	0,79
\int FPS	1	1,13	1,44	1,71	6,22	11,90	12,51
± 95 % CI		± 0,03	± 0,11	± 0,11	± 0,68	± 1,46	± 1,29

35

[0071] Estos ejemplos confirman que el \int FPS aumenta claramente según la amplitud e intensidad de la filtración UV. Las pantallas solares UVB/UVA mal equilibradas no consiguieron mejorar la protección. Esto se observó espectacularmente con pantallas solares de filtración de UVA pobre, como D y E, en las que sólo se incorporó un único filtro UVB. Para estos productos, la protección biológica real pertinente contra la radiación UV, dada por \int FPS, es espectacularmente inferior en comparación con la suposición expresada en el FPS eritemal.

40

Ejemplo 9

[0072] En comparación con PPD *in vivo* y FPS *in vivo*, \int FPS tiene en cuenta el espectro de UV solar total: UVB + UVA.

- 5 [0073] Estos efectos de medición ESR (en la profundidad de la piel) pueden conducir, por otro lado, a una mala interpretación de los valores para la cuantificación de radicales libres creados por UVB. Como se podría mostrar, este valor es aproximadamente $0,24 \times 10^{12}$ radicales / mg. Todos estos ROS están, no obstante, contenidos en un elemento de volumen de 1 mm x 1 mm x 0,05 mm con la suposición de 50 micrómetros para la epidermis media. Por lo tanto, el número de radicales libres creado en la epidermis es 3 veces superior a los de los estratos más profundos de la piel bajo la influencia de UVA, con aproximadamente $1,58 \times 10^{12}$ radicales libres/mg.
- 10 [0074] Este número de aproximadamente $4,8 \times 10^{12}$ radicales en el elemento de volumen epidérmico creado por solo UVB podría ser muy pertinente para la creación de efectos biológicos como eritema o daños en el ADN relacionado. Los primeros indicios muestran que los daños de ADN inducidos por UVB se pueden evitar con dosis altísimas de antioxidantes. Lino & al informaron de la protección contra la formación de dímero de tirriina por una combinación de vitaminas C y E medida en piel de cerdo.
- 15 [0075] Para completar los experimentos, un pantalla solar con buena protección UVA sólo se añadió al panel de muestra. 5,0 % de BMDBM fue incorporado en una base cosmética, alcanzando una fuerte absorción en el UVA y una baja absorción en el UVB (pantalla solar N, Figura 4). Como estaba previsto, se midió un FPS eritemal bajo *in vivo* = 4,7 ($\pm 1,3$). Pregunta sobre el FPS integrado: ¿no se dirigirá éste demasiado hacia un valor alto no realista, según una posible falta de sensibilidad de nuestro modelo de piel para la radiación UVB? Aplicando el nuevo método para el producto N, obtuvimos un FPS integrado comparable al FPS *in vivo*: \int FPS = 5,1 ($\pm 1,2$). Así, no puede ocurrir ninguna sobreestimación de protección UV, incluso cuando una baja protección UVB y una alta protección UVA se da en un mismo producto, como se muestra en la figura 4.
- 20 [0076] Inversamente, cualquier correlación podría darse con el FPS *in vivo*.
- 25 [0077] Dependiendo de la formulación de filtro UV, los datos de FPS *in vivo* están ampliamente por encima (si hay una protección de UVB fuerte en la pantalla solar) o son equivalentes al FPS integrado. Por supuesto, el FPS eritemal no tiene en cuenta la importancia de la amplitud de filtración UV, y así puede inducir a los consumidores a una sensación de seguridad incorrecta, principalmente para valores de FPS altos. Desde este punto de vista, el nuevo \int FPS proporciona una información avalada. El gráfico de la figura 4 resume 4 ejemplos típicos que muestran diferencias principales entre FPS eritemal y FPS integrado. Pantalla solar E con protección UVB y sin protección UVA, pantalla solar N con protección UVA pero poca protección UVB, pantalla solar G con aproximadamente la misma protección UVB y UVA y pantalla solar H con protección UVB superior a la protección UVA.
- 30 [0078] Los espectros e índices de protección muestran que el FPS eritemal es muy sensible a la filtración UVB y muy poco sensible a la filtración UVA. Opuestamente, el \int FPS de la invención es sensible a ambas filtraciones UVB y UVA.
- 35 [0079] Según el método de la invención está claro que sólo los productos con una filtración UVB / UVA amplia pueden conseguir un alto FPS integrado. Esto concuerda con el hecho de que las radiaciones UVA y UVB están implicadas en la generación de radicales libres en el totalidad de la biopsia de la piel (epidermis + dermis). Por otra parte, este nuevo factor de protección emitido por espectroscopia ESR incluye la aparición del eritema derivado de UVB y, como podría mostrarse, está en relación con el PPD de UVA *in vivo*. El FPS integrado se puede interpretar como índices UV *in vivo* tradicionales:
- 40 [0080] Un \int FPS = protección 10 significa que una persona podría permanecer 10 veces más al sol que con la piel desprotegida, sin quemarse y estando significativamente por debajo del tiempo necesario para alcanzar una respuesta de PPD. Según esto, la exposición constante al sol durante 1 hora con un producto de \int FPS = 10 proporciona a la piel menor daño de radicales libres, que corresponde a sólo 6 min de exposición directa al sol desprotegida.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un factor de protección solar integral (FPS) que abarca tanto la radiación UVA como la UVB para pantallas solares cosméticas y dermatológicas, **caracterizado por el hecho de que** el método comprende los pasos de:

(a) calibración del método por determinación de la relación numérica entre dosis de UV y generación de radicales libres midiendo la generación de radicales libres (GR) en biopsias no protegidas sometidas a diferentes dosis de UV por espectroscopia ESR, usando los datos medidos en la escala de logaritmo doble y evaluando los parámetros a y b de la ecuación (2b) por el método de error cuadrático mínimo,

$$\log(\text{Dosis UV}) = a \cdot \log(1000 \cdot X) + b \quad (2b)$$

donde X es el número real de la GR medida;

(b) aplicación de una cantidad definida de la pantalla solar directamente sobre un área definida de un sustrato de piel que se ha impregnado antes con una sustancia conocida que actúa como una trampa de giro;

(c) exposición del sustrato de piel a una cantidad definida de radiación que comprende rayos UVA y UVB según condiciones de exposición solar naturales mediante una fuente de radiación, como un simulador solar;

(d) sometimiento del sustrato de piel expuesto a radiación a una medición de resonancia de spin electrónico (ESR) entre 1 y 90 minutos después de la exposición y valoración de la generación de radicales libres (GR) por espectroscopia ESR para cada tiempo de exposición (t), donde el valor de GR medido del sustrato de piel = X_t ;

y
(e) determinación del factor de protección solar integral FPS según la ecuación (1a)

$$\int \text{FPS} = \frac{(E_0)_t}{(E)_t} \quad (1a)$$

donde $(E_0)_t$ tiene el significado de dosis de UV suministrada a la muestra de piel en mJ/cm^2 sobre la que se aplicó el producto de pantalla solar y se calcula en la ecuación (3)

$$(E_0)_t = I \cdot t \quad (3)$$

I = irradiación de simulador solar (mW / cm^2)

t = tiempo de exposición en segundos,

$(E)_t$ tiene el significado de dosis de UV eficaz en mJ/cm^2 , así relacionado con la cantidad detectada de radicales libres generados durante el paso (c)

y donde $\log_{10}(E)_t$ se calcula según el número real X_t del valor de generación de radicales libres (GR) del paso (d) con la ecuación (2a)

$$\log_{10}(E)_t = a \cdot \log_{10}(X_t \cdot 1000) + b \quad (2a)$$

donde a y b son los parámetros experimentales que se han determinado en el paso (a),

y $(E)_t$ se calcula según la ecuación

$$(E)_t = 10^{(a \cdot \log_{10}(X_t \cdot 1000) + b)}$$

2. Método según la reivindicación 1, donde la cantidad definida de pantalla solar directamente aplicada a la superficie del sustrato varía entre 1 y 4 mg por 1 cm^2 de superficie de piel en una concentración dada de pantalla solar.

3. Método según la reivindicación 2, donde otras concentraciones de pantalla solar se simulan y el método se calibra disponiendo filtros reductores de radiación estándar entre la fuente de radiación que emite una cantidad definida de radiación y el sustrato de piel.

4. Método según la reivindicación 3, donde los filtros reductores de radiación utilizados son filtros de densidad neutral con factores de reducción de 1, 2, 5, 10 y 20.

5. Método según la reivindicación 4, donde la exposición a la radiación continúa durante 30, 60, 150, 300 y 600 segundos, y más si se debiera evaluar la fotoestabilidad de la pantalla solar.

6. Método según la reivindicación 1, donde la medición ESR se realiza 15-60 minutos después de la exposición a la radiación.

7. Método según la reivindicación 1, donde el espectrómetro usado para la medición ESR tiene los siguientes parámetros:
frecuencia de microondas $f_0 = 9,52\text{GHz}$, potencia de microondas $P_\mu = 20\text{mW}$, frecuencia de modulación $f_m = 100\text{kHz}$, amplitud de modulación $B_m = 0,2\text{mT}$, exploración de campo magnético $\Delta B_s = 20\text{mT}$, tiempo de exploración $t_s = 60\text{s}$.
- 5 8. Método según la reivindicación 1, donde la trampa de spin usada es una sustancia seleccionada de fenil-tert-butilnitrona o dimetil-1-pirrolina-N-óxido.
- 10 9. Método según la reivindicación 1, donde el pantalla solar es parte de una preparación cosmética o farmacéutica y la preparación incluye uno o más filtros orgánicos y físicos conocidos seleccionados del grupo que consiste en benzofenona-3, benzofenona-4, metoxicinamato de octilo, homosalato, ácido sulfónico de fenilbenzimidazola, metoxicinamato de etilhexilo, p-metoxicinamato de isoamilo, etilhexilo triazona, dietilhexil butamido triazona, 4-metilbencilideno alcánfor, PABA, etilhexil dimetil PABA, etilhexilsalicilato, octocrileno, isoami-p- metoxicinamato, metoxidibenzoilmetano de butilo, metileno bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, bis etilhexiloxifenol metoxifenil triazina y sus mezclas derivadas.
- 15 10. Método según la reivindicación 1, donde la preparación cosmética o farmacéutica que se va a medir incorpora moléculas antioxidantes o moléculas depuradoras de radicales libres conocidas.
- 20 11. Método según la reivindicación 1, donde el sustrato de piel se selecciona del grupo que consiste en biopsias de piel, piel artificial y piezas de piel de cerdo, preferiblemente piel de las orejas de los cerdos.

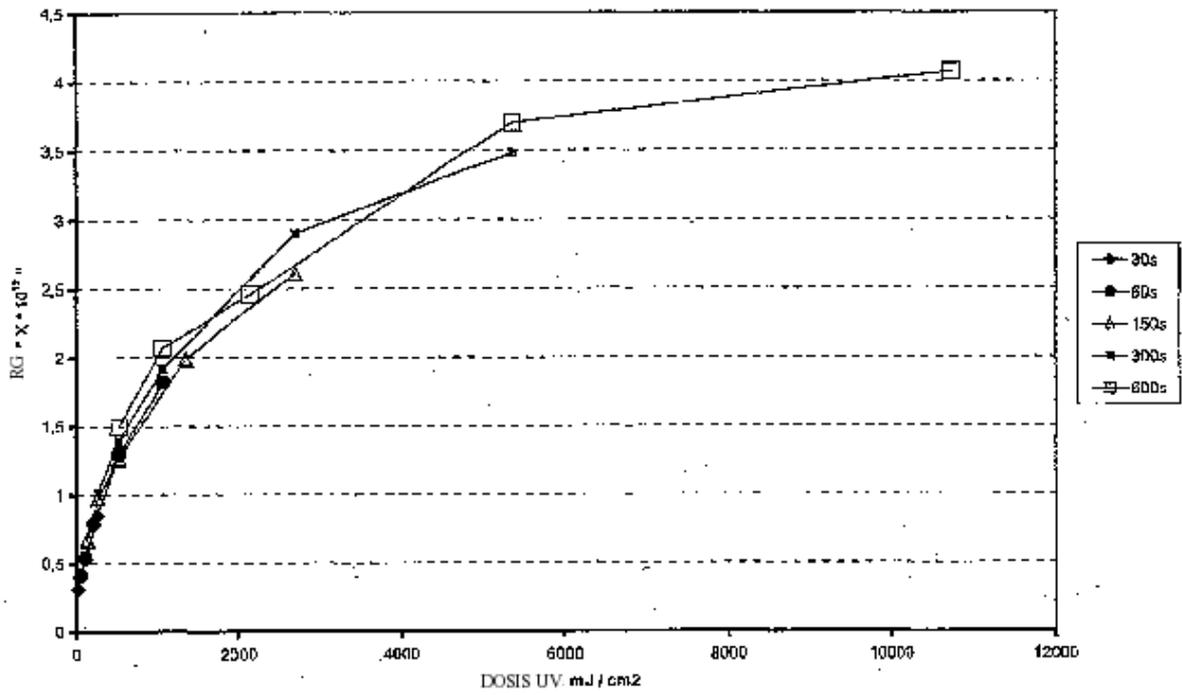


Fig. 2

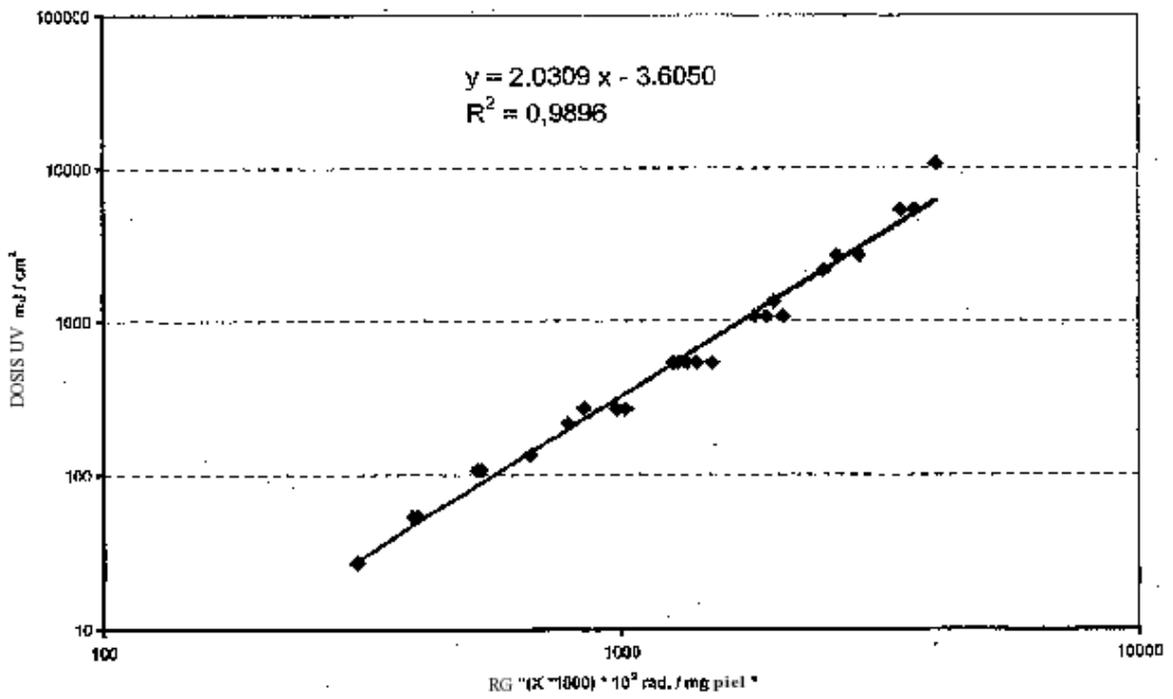


Fig. 3

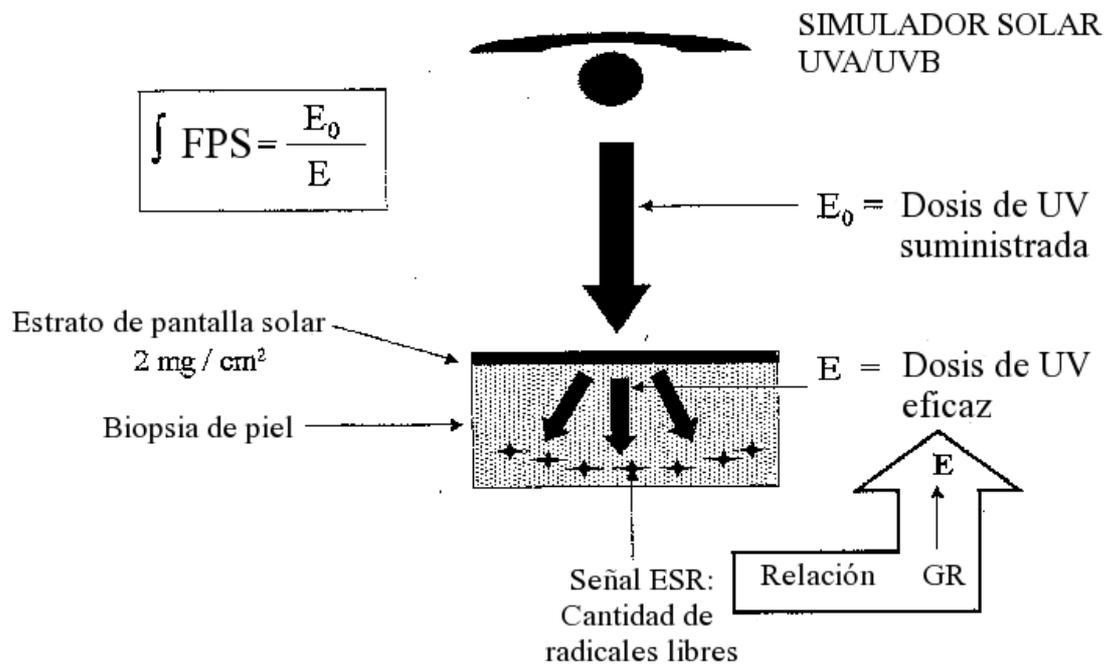


Fig. 1

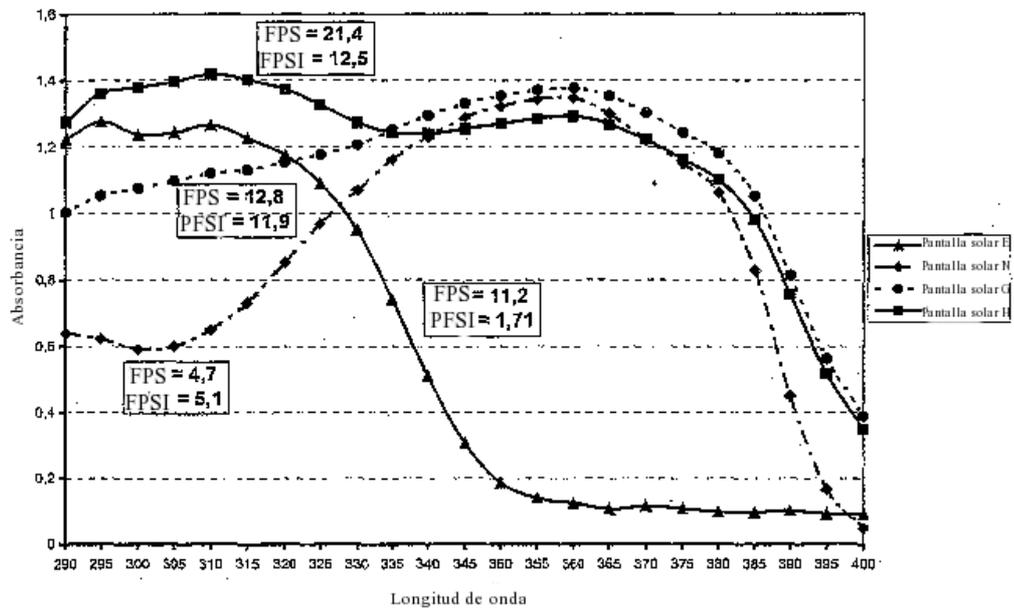


Fig. 4