

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 017**

51 Int. Cl.:

A23K 20/00 (2006.01)

A23K 50/00 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2006 PCT/EP2006/012561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2007 WO07079970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06841186 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1973418**

54 Título: **Uso de una composición nutracéutica en pienso para animales**

30 Prioridad:

13.01.2006 EP 06000669

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

20.10.2016

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**GUGEENBUHL, PATRICK y
SIMOES-NUNES, CARLOS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 587 017 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

Uso de una composición nutracéutica en pienso para animales

La presente invención se refiere a un uso novedoso de una composición nutracéutica para animales, especialmente cerdos, que comprende como principio activo ácido benzoico, derivados o metabolitos del mismo.

- 5 Ejemplos específicos de derivados del ácido benzoico que pueden dar lugar a ácido benzoico *in vivo* incluyen sales del ácido benzoico tales como los benzoatos de metal alcalino, metal alcalinotérreo y de amonio.

10 El término “nutracéutico”, como se usa en el presente documento, indica una utilidad en tanto el campo de aplicación nutricional como farmacéutico. Así, las composiciones nutracéuticas pueden encontrar uso como pienso para animales completo (dieta), como complemento para pienso para animales, y como formulaciones farmacéuticas para administración enteral o parenteral que pueden ser formulaciones sólidas, o formulaciones líquidas.

Se sabe del documento EP-A-0 683 985 que las composiciones de pienso para animales que comprenden ácido benzoico o sales del mismo pueden usarse para minimizar la emisión de amoniaco odorífero de los residuos orgánicos, especialmente excrementos de animales y estiércol.

15 También se sabe del documento WO98/08499 que las composiciones de pienso que comprenden ácido benzoico y fuentes de proteína, entre otros, 6,5 % de harina de soja y 7,1 % de pienso de gluten de maíz, pueden usarse como un medicamento para los animales para promover el crecimiento de los mismos y mejorar la digestibilidad de los aminoácidos alimentados a tales animales.

20 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que, además de la función anterior, el ácido benzoico y las sales del mismo tienen la ventaja de ser capaces de mejorar la digestibilidad de proteínas en piensos para animales, es decir, de promover la asimilación de aminoácidos y de nitrógeno, y de aumentar los niveles de energía totales.

Además, se ha encontrado que el ácido benzoico mejora la digestibilidad del pienso para animales/piensos que contienen harina de maíz-soja como una parte importante de la fuente de proteína.

El término “energía” y “nivel de energía”, como se usa en el presente documento, indica los niveles de energía totales de las dietas y contenidos ileales determinados por medición calorimétrica.

25 El término “asimilación de nitrógeno” y “nitrógeno total”, como se usa en el presente documento, indica la concentración de nitrógeno total determinada en las dietas liofilizadas y contenidos ileales.

El término “asimilación de aminoácidos” y “aminoácidos totales”, como se usa en el presente documento, indica los aminoácidos totales determinados después de una hidrólisis ácida en las dietas liofilizadas y contenidos intestinales.

30 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición que comprende ácido benzoico o un derivado del ácido benzoico capaz de dar lugar a ácido benzoico libre *in vivo* para mejorar la digestibilidad de proteínas y/o la asimilación de aminoácidos y/o nitrógeno en animales y/o de aumentar los niveles de energía totales en piensos para animales.

35 Además, la presente invención se refiere al uso novedoso de ácido benzoico con el fin de mejorar la digestibilidad de proteínas y/o la asimilación de aminoácidos y/o nitrógeno en animales y/o de aumentar los niveles de energía totales en piensos para animales.

Particularmente, la presente invención se refiere al uso novedoso de ácido benzoico o un derivado de ácido benzoico en una composición de pienso que comprende harina de maíz-soja como una parte importante de la fuente de proteínas para la asimilación de aminoácidos y/o nitrógeno en animales, y para aumentar los niveles de energía totales en piensos para animales.

40 El animal puede seleccionarse de aves de corral, cerdos y ganado vacuno.

El ácido benzoico o un derivado del mismo capaz de dar lugar a ácido benzoico *in vivo* puede administrarse a los animales como un componente de una composición nutracéutica que se alimenta convencionalmente a los animales. Así, el ácido benzoico y los derivados del mismo pueden administrarse adecuadamente a los animales como un componente del pienso para animales o en su agua para beber.

45 La cantidad de ácidos benzoicos o un derivado de los mismos administrada al animal está en el intervalo de 0,001 - 5 % basado en el peso total de cada pienso alimentado al animal. Esta cantidad puede, sin embargo, ser mayor si la función del ácido benzoico o un derivado del mismo también es para controlar el pH de los excrementos de los animales alimentados con una dieta tal con el fin de suprimir la emisión de amoniaco de los excrementos. Tales cantidades más altas están adecuadamente limitadas a un máximo de aproximadamente el 10 % basado en la composición de pienso para animales total.

50

En una realización preferida de la invención, el ácido benzoico o un derivado de ácido benzoico se usa en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación diaria de 200 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 600 mg por kg de peso corporal del sujeto al que va a administrarse.

5 Además, la presente invención se refiere a un método de alimentación de un animal que comprende proporcionar al animal un pienso que comprende una fuente de proteínas, en el que la asimilación de aminoácido por el animal es superior al 80 % en peso/peso en comparación con la cantidad total de aminoácidos añadidos y/o la asimilación de nitrógeno por el animal es superior al 74 % en peso/peso en comparación con la cantidad total de nitrógeno añadido.

10 Finalmente, la invención también se refiere a un método de aumento de la cantidad de nitrógeno y/o aminoácidos totales metabolizables por un animal. Este método comprende proporcionar al animal para su ingestión una cantidad eficaz de ácido benzoico o un derivado de ácido benzoico que está presente como ingrediente del pienso ingerido por el animal.

Una formulación típica para una composición de pienso para animales se muestra en la Tabla 1 a continuación en la que todas las cantidades mostradas en % en peso se alimentaron a cerdos:

Tabla 1

Ingredientes	%
Harina de carne (58 % de proteína cruda)	3,20
Melaza	5,00
Trigo	5,90
Harina de soja (45 % de proteína cruda)	15,10
Tapioca (66 % de almidón)	35,50
Trigo molido	15,00
Grasa animal	3,30
Caliza	0,74
Clorhidrato de lisina (98 %)	0,06
Premezcla de vitaminas	0,50
Oligoelementos	0,50
Harina de girasol	12,20
Cloruro de amonio	2,00
Benzoato de amonio	1,00

15 Así, el ácido benzoico o un derivado del mismo puede usarse en combinación con ingredientes convencionales presentes en una composición de pienso para animales (dieta) tal como carbonatos cálcicos, electrolitos tales como cloruro de amonio, proteínas tales como harina de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, harina de carne y de huesos, aminoácidos, grasas animal, vitaminas y oligoelementos.

20 En una composición tal, la relación del electrolito con respecto al ácido benzoico o un derivado del mismo está adecuadamente en el intervalo de 0,5 : 1 a 5 : 1 peso/peso, preferentemente de 1,5 : 1 a 3 : 1 peso/peso.

El ácido benzoico o un derivado del mismo es particularmente eficaz para mejorar la digestibilidad de las proteínas y la asimilación de aminoácidos y nitrógeno en animales tales como aves de corral, cerdos o ganado vacuno, especialmente cerdos.

25 La presente invención se ilustra adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo, que muestra los efectos del ácido benzoico sobre la digestibilidad aparente ileal de nitrógeno, energía y aminoácidos en lechones con anastomosis íleo-rectal

Ensayo en animales

Se usaron diez lechones Large White x Landrace x Piétrain. Los animales se obtuvieron de GAEC Leclerc, F-68150 Ostheim y tuvieron 60 días de edad al principio del experimento.

- 5 Cada animal se sometió a una anastomosis íleo-rectal según las técnicas descritas por Laplace et al. (1994). Después de la cirugía, los lechones se alojaron individualmente en jaulas metabólicas de acero inoxidable en una sala para animales bajo temperatura controlada (22 °C), humedad (50 %), ventilación (1100 m³/h) e iluminación (ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad). Los animales tuvieron un periodo de recuperación post-quirúrgica de 10 días, también requerido para estabilizar el consumo de alimentos. Mientras tanto se alimentaron a voluntad con una dieta basada en verduras para lechones y tuvieron acceso libre a agua del grifo.
- 10 Durante el periodo experimental, los lechones se alimentaron cada uno y alternativamente con la dieta basada en verduras complementada o no con 0,5 % de ácido benzoico.

La composición de pienso y las 2 dietas experimentales se presentan en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2

Ingredientes	(%)
Maíz	53,0
Harina de soja	18,0
Cebada	13,0
Harina de avena	6,0
Salvado de trigo	5,4
Aceite de soja	1,0
Minerales, vitaminas y aminoácidos sintéticos	3,6
Proteína cruda - N x 6,25	15,5
Lisina	0,96
Metionina + Cistina	0,54
Energía digerible estimada	13,31 MJ/kg

- 15 Se añadió un trazador indigerible, óxido de cromo, a una concentración del 0,4 % a todas las dietas con el fin de medir la digestibilidad aparente ileal.

Tabla 3

Dieta	A	B
Complementada con 0,5 % de ácido benzoico	-	+
Dosificación programada (mg/kg)	0	5

- 20 La experiencia estuvo compuesta de 2 periodos de 12 días cada uno divididos en 10 días de adaptación y en 2 días de muestreo de contenido ileal.

El protocolo del diseño se presenta en la Tabla 4. Cada animal se alimentó alternativamente con cada dieta, de manera que cada dieta se probó 10 veces.

El estado de salud del animal se controló diariamente.

Tabla 4

Periodo experimental	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Dieta experimental									
Periodo 1	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Periodo 2	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A

5 Para las estimaciones de digestibilidad, se recogieron diariamente muestras del contenido ileal, durante los 2 días de muestreo, de 8 AM a 3 PM, tan pronto como se produjeron. Inmediatamente después de cada muestreo, los contenidos recogidos se pesaron y se congelaron a -80 °C. Se agruparon todas las muestras diarias del mismo lechón. Antes del análisis, las muestras se liofilizaron y se molieron dando un polvo fino. Se obtuvo un total de 20 muestras para cada dieta.

Métodos analíticos

10 Los contenidos de materia seca de las muestras liofilizadas se determinaron después de secar durante la noche a 105 °C, 20 g de las dietas y 15 g de las muestras ileales, según el procedimiento estándar de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) (1990).

Se determinaron las dietas y los niveles de óxido de cromo de muestras ileales por espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP) después de la mineralización a 350 °C durante 20 min con reactivo oxidante.

15 Se determinó el contenido de ácido benzoico en el pienso por HPLC.

Se determinaron los niveles de energía totales en las dietas liofilizadas y los contenidos ileales usando un calorímetro IKA C7000.

Se analizaron cantidades de polvo liofilizado de aproximadamente 400 mg 3 veces para cada muestra.

20 Se determinaron las concentraciones de nitrógeno total en las dietas liofilizadas y los contenidos ileales usando un analizador de nitrógeno LECO FP-428.

Se analizaron las cantidades de polvo liofilizado de aproximadamente 100 mg 3 veces para cada muestra.

25 Los aminoácidos totales se determinaron después de una hidrólisis ácida en las dietas liofilizadas y los contenidos intestinales. Se omitió el análisis de triptófano. Se analizaron Cys y Met como ácido cistéico y metionina sulfona después de la oxidación con ácido fórmico y peróxido de hidrógeno, seguido de una hidrólisis ácida a 110 °C con HCl 6 N. Todos los aminoácidos se analizaron después de una hidrólisis ácida a 110 °C con HCl 6 N.

Se midieron concentraciones de aminoácidos individuales después de la derivación usando el reactivo AccQ.Fluor de Waters y se cuantificaron por HPLC de fase inversa por detección por fluorescencia después de elución en una columna Pico.Tag C18.

30 Los datos se registraron con el software Millenium de Waters para la adquisición, integración y tratamiento de datos. La cuantificación se realizó con un patrón interno usando el área del pico. El método detallado se describió en Roche R&D Memorandum B-171'680.

Se analizaron cantidades de polvo liofilizado de aproximadamente 50 mg dos veces para cada muestra.

Análisis de datos

35 Corrigiendo con la materia seca, el óxido de cromo y las concentraciones de los parámetros probados de la dieta, todos los niveles de parámetros probados de los contenidos ileales liofilizados se expresaron en % de digestibilidad aparente usando la siguiente fórmula:

$$Digestibilidad (\%) = 100 - \left[\frac{(Ci \times Md)}{(Mi \times Cd)} \times 100 \right]$$

Ci = concentración parámetro (% de materia seca) en el contenido ileal

40 Cd = concentración parámetro (% de materia seca) en la dieta

Mi = concentración de óxido de cromo (% de materia seca) en el contenido ileal

Md = concentración de óxido de cromo (% de materia seca) en la dieta

5 Para cada grupo de prueba, el análisis estadístico de los datos implicó el cálculo de la media y la desviación estándar de la media, además de un análisis de la varianza seguido de la prueba de la "t" de Student para evaluar la significancia de diferencias de grupos entre el grupo A y el grupo B complementado con ácido benzoico para una probabilidad del 10 % para los aminoácidos y 5 % para nitrógeno y energía.

Resultados

10 Al principio del estudio todos los lechones se habían recuperado de la anestesia y la cirugía. Ninguno de los animales mostró durante el periodo experimental ningún síntoma de enfermedad o toxicosis. Pudieron lograrse todas las alimentaciones y todos los muestreos.

Los resultados del ácido benzoico en contenidos de pienso se presentan en la Tabla 5. Cada dieta se analizó dos veces.

Tabla 5

Dieta	A	B
Complementada con 0,5 % de ácido benzoico	-	+
Dosificación programada (mg/kg)	0,0	5,0
Ácido benzoico medido (mg/kg)	0,0	4,6
Recuperación (%)	-	92,0

15 El contenido de ácido benzoico observado en el pienso complementado estuvo de acuerdo con el nivel de inclusión programado para la dieta B.

20 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de energía se muestran en la Figura 1. La Figura 1 muestra la digestibilidad de energía aparente ileal en los lechones alimentados con una dieta sin o con complementación de 0,5 % de ácido benzoico. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de energía aparente ileal fue del $69,5 \pm 4,6$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de energía aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $72,6 \pm 4,7$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) del 4,4 %.

25 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de nitrógeno total se muestran en la Figura 2. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de nitrógeno total aparente ileal fue del $73,8 \pm 5,8$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de nitrógeno total aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $77,7 \pm 3,1$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) del 5,3 %.

30 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de aminoácidos totales se muestran en la Figura 3. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de aminoácidos totales aparente ileal del $79,7 \pm 4,8$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de aminoácidos totales aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $82,0 \pm 2,7$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,10$) del 2,9 %.

Los aminoácidos esenciales pueden no ser sintetizados en cantidades suficientes por el cuerpo y, por tanto, deben suministrarse de la degradación de proteínas del pienso. Los aminoácidos esenciales en los cerdos son Arg, Cys², His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Tyr, Val.

35 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de aminoácidos esenciales se muestran en la Figura 4. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de aminoácidos esenciales aparente ileal fue del $80,4 \pm 4,9$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de aminoácidos esenciales aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $82,7 \pm 2,6$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,10$) del 2,9 %.

40 Hay 3 aminoácidos sulfurados metionina (Met), cisteína (Cys) y cistina (Cys²). Bajo condiciones fisiológicas, la Cys y la Cys² se convierten entre sí naturalmente.

Además del hecho de que la Met y la Cys son aminoácidos indispensables para el cerdo, también tienen una función esencial como constituyente de todas las proteínas.

Además, la Met también desempeña una parte importante en la síntesis de proteínas y como proveedor de grupos metilo, y la Cys participa en el almacenamiento y el transporte de azufre y en diversas síntesis como la del glutatión. La Cys² también es necesaria para la formación de piel.

5 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de aminoácidos sulfurados se muestran en la Figura 5. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de aminoácidos sulfurados aparente ileal fue del $77,8 \pm 4,9$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de aminoácidos sulfurados aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $80,1 \pm 3,5$ %, representando un aumento estadísticamente no significativo ($p \leq 0,10$) del 2,9 %.

10 Se necesitan aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile y Val) para el mantenimiento del tejido muscular y para preservar las reservas de glucógeno como fuente de energía para el músculo. También ayudan a prevenir la degradación de proteínas durante el ejercicio y así a conducir a una mayor masa magra.

15 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de aminoácidos de cadena ramificada se muestran en la Figura 6. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de aminoácidos de cadena ramificada aparente ileal fue del $80,4 \pm 5,3$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de aminoácidos de cadena ramificada aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $82,7 \pm 2,8$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,10$) del 2,9 %.

La lisina es un aminoácido esencial en el sentido estricto que no se biosintetiza en absoluto *in vivo*. La lisina tiene un marcado efecto sobre el crecimiento. El bajo contenido de lisina en proteínas vegetales representa un problema significativo para la nutrición.

20 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de lisina se muestran en la Figura 7. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de lisina aparente ileal fue del $79,5 \pm 5,7$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de lisina aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $82,3 \pm 2,8$ %, representando un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,10$) del 3,5 %.

25 La treonina es como la lisina, un aminoácido esencial nutricionalmente indispensable para el crecimiento. La eficiencia de la utilización de treonina por el animal, de fuentes de proteínas, es difícil debido a la dificultad de romper los enlaces peptídicos en los que participa la treonina. Por este motivo, la treonina se considera que es el segundo aminoácido requerido después de la lisina para la complementación en la dieta.

30 Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de treonina se muestran en la Figura 8. En la dieta no complementada de control, la digestibilidad de treonina aparente ileal fue del $76,0 \pm 5,5$ %. En comparación con el grupo de control, la digestibilidad de treonina aparente ileal del grupo complementado con 0,5 % de ácido benzoico fue del $78,0 \pm 3,9$ %, representando un aumento estadísticamente no significativo ($p \leq 0,10$) del 2,7 %.

35 Los aminoácidos son antes que nada las piedras de la síntesis de proteínas y, por tanto, la base del aumento de músculo. La mayoría de ellos son glucogénicos, algunos también participan en el metabolismo de los ácidos grasos. Los aminoácidos participan en la desintoxicación de amoníaco, son precursores de glutatión, creatina, hormonas, neuropéptidos, vitaminas y otros compuestos protéicos fisiológicos.

Los resultados de la digestibilidad aparente ileal de los aminoácidos individuales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Aminoácido	Digestibilidad media $\pm \sigma$ (%)	
	Control	Ácido benzoico 0,5 %
Ala	$72,1 \pm 6,5$	$75,3 \pm 3,7$
Arg	$84,8 \pm 3,9$	$87,0 \pm 1,8$
Asp+Asn	$76,1 \pm 6,5$	$79,1 \pm 3,2$
Cys	$77,2 \pm 5,0$	$79,7 \pm 4,4$
Glu+Gln	$84,8 \pm 4,3$	$86,7 \pm 2,1$
Gly	$72,7 \pm 5,3$	$75,1 \pm 4,4$
His	$84,3 \pm 4,6$	$86,4 \pm 2,5$
Hyp	$39,8 \pm 11,0$	$41,4 \pm 13,4$

ES 2 587 017 T3

Aminoácido	Digestibilidad media $\pm \sigma$ (%)	
	Control	Ácido benzoico 0,5 %
Ile	78,5 \pm 6,9	81,5 \pm 3,6
Leu	82,8 \pm 4,5	84,5 \pm 2,4
Lys	79,5 \pm 5,7	82,3 \pm 2,8
Met	78,9 \pm 5,4	80,7 \pm 3,5
Phe	82,4 \pm 4,6	84,5 \pm 2,3
Pro	84,6 \pm 3,1	85,8 \pm 2,4
Ser	80,6 \pm 4,5	82,6 \pm 2,9
Thr	76,0 \pm 5,5	78,0 \pm 3,9
Tyr	78,6 \pm 5,0	80,8 \pm 2,8
Val	76,1 \pm 6,4	79,5 \pm 3,6

REIVINDICACIONES

1. Uso de ácido benzoico o un derivado del ácido benzoico en una composición de pienso que comprende harina de maíz-soja como parte principal de la fuente de proteínas para la asimilación de aminoácidos y/o nitrógeno en animales.
- 5 2. Uso de ácido benzoico o un derivado de benzoico en una composición de pienso que comprende harina de maíz-soja como parte principal de la fuente de proteínas para aumentar los niveles de energía totales en piensos para animales.
3. Uso como en la reivindicación 1 o 2, en el que el animal está seleccionado de aves de corral, cerdos y ganado vacuno.
- 10 4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido benzoico o un derivado de ácido benzoico se usa en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación diaria de 200 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 600 mg por kg de peso corporal del sujeto que va a administrarse.

Figura 1

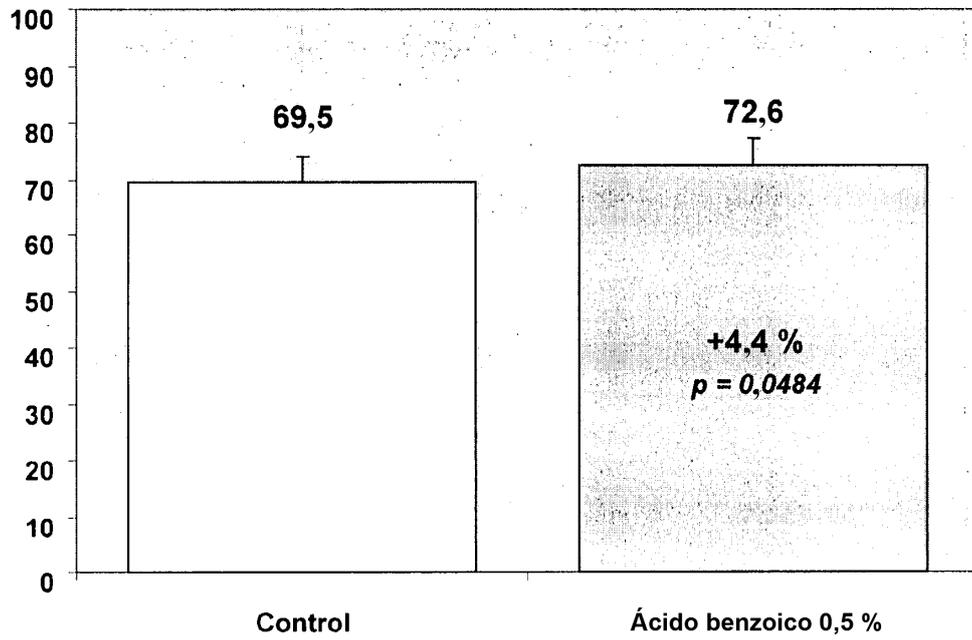


Figura 2

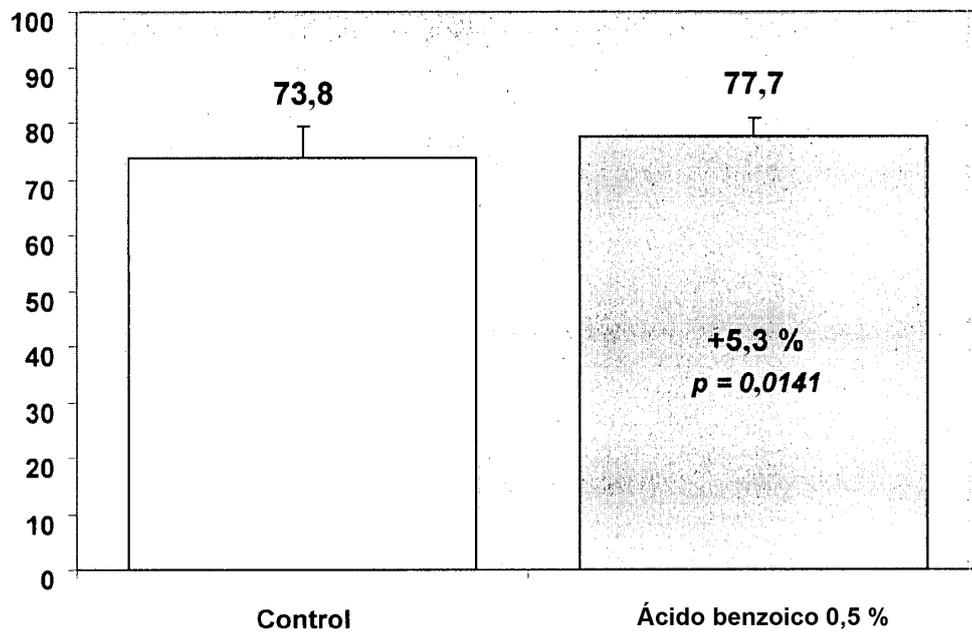


Figura 3

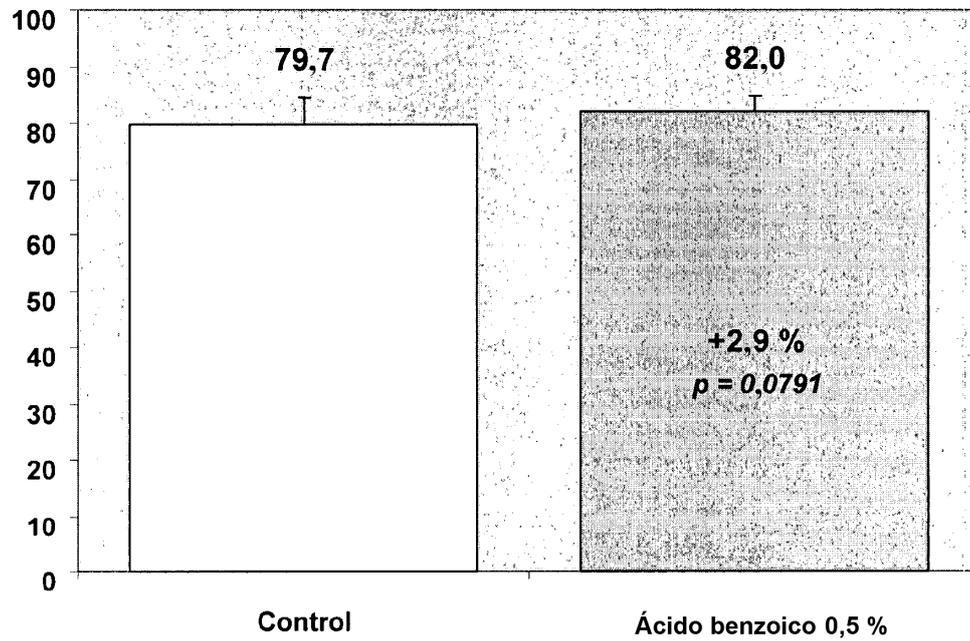


Figura 4

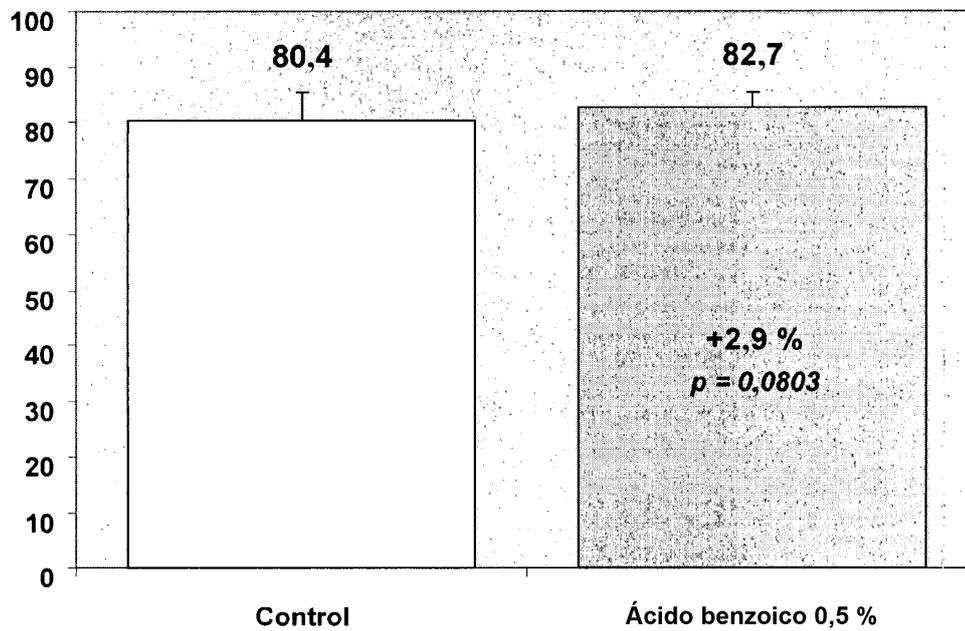


Figura 5

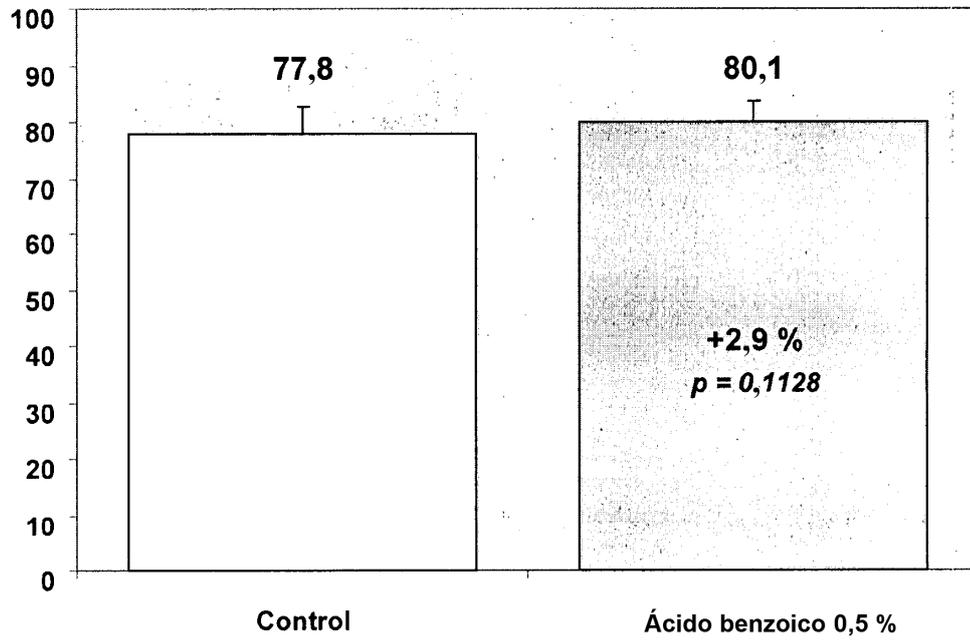


Figura 6

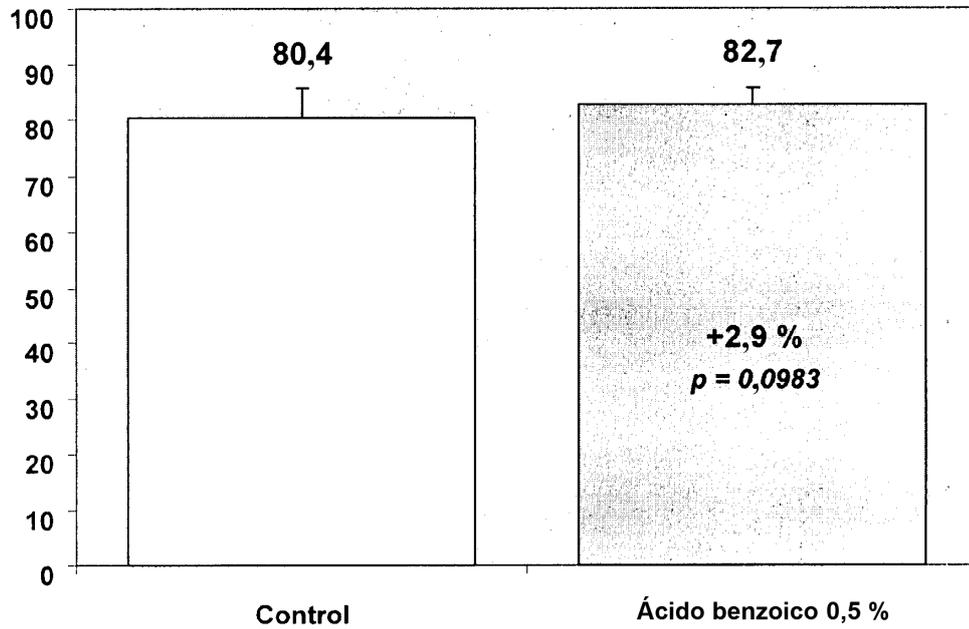


Figura 7

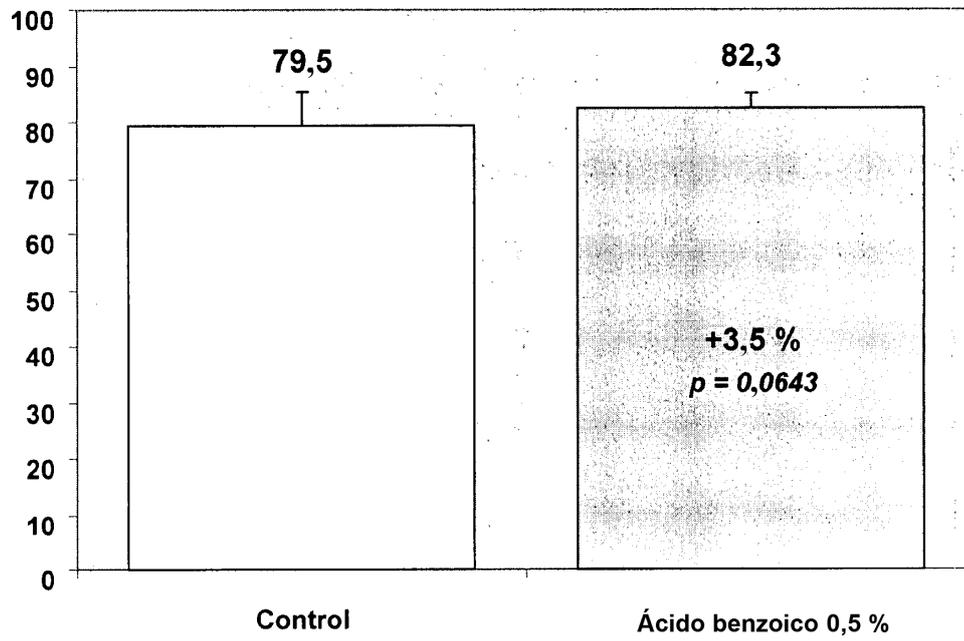


Figura 8

