



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 01031

(22) Data de depozit: 03/12/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• EPI-SISTEM S.R.L., BD.BRAȘOVULUI
NR.145, SĂCELE, BV, RO

(72) Inventatori:
• DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GURBAN ANA-MARIA,
STR.SG.NIȚU VASILE NR.68, BL.26, SC.1,
AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• EPURE PETRU, BD.GRIVIȚEI NR.56,
BL.10, SC.B, AP.16, BRAȘOV, BV, RO

(54) **PROCEDEU DE REALIZARE A UNEI PLATFORME
DE IMUNOANALIZĂ BAZATĂ PE DETECȚIE
ELECTROCHIMICĂ COMBINATĂ CU REZONANȚA
PLASMONILOR DE SUPRAFAȚĂ PENTRU METODĂ
DE DETERMINARE SELECTIVĂ A MICOTOXINELOR**

(57) Rezumat:

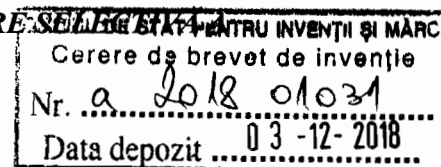
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei platforme de imunoanaliză pentru determinarea selectivă a micotoxinelor din probe alimentare. Procedeu conform invenției constă prin electrodepunerea pe un electrod de lucru format din film de aur realizat pe suport de sticlă sau cuarț, prin voltametrie ciclică, a unui film polimeric dintr-o soluție apoasă de 2,6-dihidroxi-naftalină cu concentrație de 0,5...5 mM, 2-(4-amino-fenil)-etilamină, cu concentrație de 1...14 mM, 10...100 μg/ml anticorp anti-micotoxină țintă și

0,002...0,05% glutaraldehidă, prin realizarea a 10...14 cicluri, cu o viteză de scanare de 2...50 mV/s în intervalul (-0,5...0,1) V...(0,8...1,2) V, rezultând un material imunosenzitiv pentru detecția rapidă electrochimică și optică a micotoxinelor din probe alimentare lichide.

Revendicări: 2
Figuri: 5



**PROCEDEU DE REALIZARE A UNEI PLATFORME DE IMUNOANALIZĂ BAZATĂ PE
DETECȚIE ELECTROCHIMICĂ COMBINATĂ CU REZONANȚA PLASMONILOR DE
SUPRAFAȚĂ PENTRU METODĂ DE DETERMINARE
MICOTOXINELOR**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei platforme imunosensibile, atât din punct de vedere electrochimic, cât și din punct de vedere al rezonanței plasmonilor de suprafață, pentru determinarea selectivă a micotoxinelor din probe complexe.

Micotoxinele reprezintă compuși naturali cu masă moleculară relativ mică, care apar ca metaboliți secundari ai dezvoltării ciupercilor parazite (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* și *Alternaria*) în produse vegetale (cereale, fructe, cafea, oleaginoase, condimente) cultivate, depozitate și utilizate ca hrană pentru animale și oameni. Contaminarea cu micotoxine se produce prin ingerarea alimentelor contaminate, în mod direct prin plante sau indirect prin produse animale (ex. ouă, lapte, carne), inducând efecte adverse asupra sănătății umane și animale (cancerigene, teratogene, mutagenice, nefrotoxice, hepatotoxice și imunotoxice). Din cele peste 300 de substanțe denumite micotoxine, aflatoxinele, ocratoxina A, deoxinivalenona, fumanozinele, patulina, zearalenona și ergotaminele reprezintă contaminanții cel mai des întâlniți în alimente și furaje, având efecte negative puternice asupra sănătății umane și a economiei.

Având în vedere că micotoxinele se regăsesc în produsele alimentare la concentrații de ordinul ng/L (aflatoxine), respectiv μg/L (ocratoxina A, patulina etc), detecția precoce a acestor metaboliți reprezintă un indicator relevant al factorului de risc asupra sănătății umane, astfel fiind necesare sisteme de analiză foarte sensibile, rapide și accesibile pentru detectarea și cuantificarea acestora. În general, metodele dezvoltate pentru detecția și monitorizarea micotoxinelor sunt metode cromatografice (HPLC, TLC) cu detecție fluorimetrică sau cu captură de electroni (GC/MS, LC/MS) și imunochimice de tip ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays), radioimunoanaliza și imunoanaliză prin injectare secvențială.

Metodele menționate mai sus sunt sensibile, dar prezintă o serie de dezavantaje: sunt scumpe, necesitând echipamente și kit-uri de analiză scumpe, sunt laborioase și consumatoare de timp, necesitând mai multe etape complexe de pre-tratare a probelor, de derivatizare și/sau spălare și personal specializat, fiind adecvate pentru aplicații de laborator și nu pentru determinarea in situ a micotoxinelor. Imunostipurile sau imunodiprotele s-au dezvoltat pentru o metodă rapidă de screening a unui număr restrâns de micotoxine, anticorpilor specifici fiind în acest caz conjugați cu nanoparticule de aur care furnizează o culoare roșie vizuală a zonei de

legare. Această metodă deși simplă și eficientă, putând furniza rezultate în 10 minute, este utilizată pentru detectarea la fața locului a unui număr relativ restrâns de micotoxine, putând fi utilizate numai pentru o singură probă, iar pentru fiecare analiză sunt necesare cantități mari de conjugat ai toxinelor, crescând în acest fel costul analizei.

Ca alternativă la metodele cromatografice și ELISA, pentru determinarea sensibilă și rapidă a micotoxinelor cu masa moleculară mică (<500 Da) au fost dezvoltate diferite tipuri de imunosenzori bazați pe diverse tipuri de detecție, cum ar fi: detecția optică (rezonanță a plasmonilor de suprafață - SPR, chemiluminiscența, fibră optică pe bază de undă evanescentă), detecția undei acustice de suprafață, detecția piezoelectrică și detecția electrochimică.

Brevetul **WO2013/157917** descrie realizarea unui imunosenzor pentru detecția electrochimică a aflatoxinei B1. Imunosenzorul a fost realizat prin imobilizarea unor nanoparticule de aur conjugate cu anticorp monoclonal specific pentru aflatoxina B1 și enzima peroxidază din hrean (HRP) pe suprafața unui electrod serigrafiat din pastă de cărbune, iar detecția aflatoxinei B1 din probe de alune s-a realizat prin măsurători cronoamperometrice. Acest senzor prezintă dezavantajul unei modificări laborioase folosindu-se soluții coloidale de nanoparticule de aur, anticorp și enzime, precum și numeroase etape de pre-tratare a probelor prin extracții în solvenți organici.

Brevetul **WO2014/155391** se referă la un dispozitiv analitic pentru determinarea aflatoxinelor M1 și B1 din lapte și alune, bazat pe măsurători de impedanță utilizând un cip sensibil. Acest cip constă într-o rețea de electrozi de aluminiu depuși pe substrat de sticlă prin tehnica de fotolitografie și modificați cu anticorpi monoclonali specifici acestor toxine prin legare covalentă, utilizând acidul 11-mercaptoundecanoic. Dezavantajul acestui dispozitiv constă în timpul foarte mare de realizare, fiind necesari timpi de incubare de mai mult de 12 h pentru pregătirea suprafeței dispozitivului în vederea modificării cu anticorpii specifici micotoxinelor de interes.

În literatură este descris un număr de dispozitive analitice bazate pe anticorpi [R, Chauhan, J, Singh, T. Sachdev, T. Basu, B.D. Malhotra, Biosens. Bioelectron. 2016, 81, 532-545] sau aptameri, [L. Xu, Z.W. Zhang, Q. Zhang, P.W. Li, Toxins 2016, 8, 239] pentru detecția unor micotoxine, dar cea mai mare parte a acestora prezintă etape costisitoare și îndelungate de imobilizare a anticorpului sau aptamerului specific pe suprafețele sensibile, precum și o limitare a detecției unui anumit tip de micotoxină.

Astfel, este necesară realizarea unui material electrosenzitiv care să permită determinarea rapidă și selectivă a micotoxinelor din probe lichide complexe, fără să existe o pregătire laborioasă a acestora.

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție constă în realizarea unei platforme de imunoanaliză duală, electrochimică și optică, bazată pe un material imunosenzitiv, obținut prin încorporarea anticorpului specific micotoxinei țintă într-un film polimeric de 2,6-dihidroxi-naftalină și 2-(4-aminofenil)-etilamină electrodepus pe suprafața unui electrod de lucru format dintr-un film de aur de 50 nMm realizat pe suport de sticlă, care permite detecția sensibilă a micotoxinei țintă din probe complexe pe baza utilizării cvasi-simultane a detecției electrochimice și a principiului SPR.

Procedeele de obținere a materialului imunosenzitiv s-a realizat prin electrodepunere pe electrodul de lucru din film de aur, prin voltametrie ciclică în soluție apoasă de 2,6-dihidroxi-naftalină cu concentrație de 0,5...5mM, 2-(4-aminofenil)-etilamină cu concentrație de 1,0...14 mM, anticorp anti-micotoxină 10...100 $\mu\text{g/mL}$ și glutaraldehidă 0,002...0,05%, prin realizarea unui număr de 10...40 cicluri, cu o viteză de scanare de 2...50 mV/sec în intervalul (-0,5...0,1)V – (0,8...1,2)V.

Metoda de determinare a micotoxinelor din probe lichide conform invenției constă în utilizarea unei platforme combinate de detecție duală și a principiului competiției de suprafață, procesul de imuno-recunoaștere fiind monitorizat indirect, prin detecția electrochimică (ELEC) a activității enzimei utilizate ca marker (label) în bioconjugat, cât și direct, prin rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR). Pentru detecția SPR și ELEC a micotoxinei țintă, platforma de imunoanaliză combinată se incubează între 20 – 40 min cu un amestec de probă cu o concentrație cunoscută de bioconjugat format din micotoxină și o biomoleculă, care pe de o parte are masă moleculară mare pentru a putea fi detectată prin SPR, și pe de altă parte prezintă efect catalitic asupra unui substrat electrochimic activ, un exemplu foarte bun al unei astfel de biomolecule fiind peroxidaza din hrean (HRP).

În general, senzorii de tip SPR sau cu undă acustică de suprafață, prezintă inconvenientul că nu furnizează un răspuns analitic detectabil atunci când analitul care interacționează cu anticorpul sau enzima imobilizată pe suprafața sensorului are masă moleculară mică (sub 1000 Da), așa cum este cazul micotoxinelor (<500 Da). Pentru a depăși acest dezavantaj se folosește metoda competiției de suprafață, metodă în care pentru situsurile de legare ale anticorpului imobilizat există o competiție între micotoxina țintă și un bioconjugat al acesteia. Bioconjugatul este format dintr-o biomoleculă cu masă moleculară mare și micotoxina respectivă, care în

general are masa moleculară mică. Întrucât bioconjugatul interacționează selectiv cu anticorpul specific în mod similar cu micotoxina nelegată, va apărea o competiție între acestea pentru anticorpul imobilizat la suprafața senzorului, în urma căreia se produce o variație detectabilă a semnalului SPR al imunosenzorului.

După incubarea platformei de imunoanaliză cu amestecul de micotoxină și bioconjugat, suprafața acesteia este spălată cu tampon fosfat și apoi se măsoară semnalul SPR față de semnalul înregistrat înainte de incubare. Variația semnalului SPR va fi indirect proporțională cu concentrația de micotoxină din proba de analizat.

Detecția electrochimică a micotoxinei va fi realizată amperometric prin determinarea activității enzimatică a HRP-ului din bioconjugatul legat de anticorpul imobilizat în materialul imosenzitiv al platformei de imunoanaliză, pe baza reacției catalizată de HRP, dintre apa oxigenată de concentrație 1...10 mM și 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) de concentrație 0,3...5,0 mM în tampon fosfat-citrat pH 5.0...6.0, la potențiale aplicate în domeniul -0.2...+0.2 V. În mod similar detecției SPR, răspunsul amperometric al imunosenzorului combinat va fi invers proporțional cu concentrația de micotoxină din probă.

Procedeul de analiză și metoda pot fi utilizate pentru determinarea oricărei micotoxine pentru care există disponibili anticorpi și bioconjugate micotoxină-HRP folosind platforma de imunoanaliză realizată conform invenției. Având în vedere variabilitatea mare a acestor bioconjugate, pentru aplicarea metodei de analiză este necesară realizarea următoarelor optimizări pentru fiecare exemplu de micotoxină, anticorp și bioconjugat:

a) Selectarea concentrației de lucru a bioconjugatului micotoxină-HRP astfel încât să fie asigurată competiția dintre micotoxină și conjugat pentru anticorpul imobilizat în filmul imosenzitiv de la suprafața platformei de imunoanaliză. Aceasta se realizează prin incubarea platformei de imunoanaliză, realizată conform invenției, cu soluții cu concentrație fixă de micotoxină și concentrații crescătoare de conjugat. După atingerea echilibrului de formare a complexului antigen-anticorp, suprafața imunosenzorului este spălată prin clătire ușoară cu tampon fosfat sau dacă imosenzorul este plasat într-o celulă în flux prin pomparea soluției tampon cu ajutorul unei pompe. Ulterior se măsoară cele două semnale astfel:

- Semnalul SPR obținut după incubarea amestecului de micotoxina (notat Ag, antigen) cu bioconjugatul (notat AgHRP) va fi notat $SPR_{Ag + AgHRP}$ și va fi raportat la semnalul obținut pentru imunosenzorul incubat numai cu soluție tampon, notat SPR_{blank} . Reprezentarea grafică a raportului $(SPR_{Ag + AgHRP} - SPR_{blank}) / SPR_{blank}$ în funcție de concentrația bioconjugatului C_{AgHRP} este fitată în imunoanaliză folosind o ecuație logistică cu patru

parametri. Concentrația optimă / de lucru a bioconjugatului corespunde unei capacități de legare a micotoxinei țintă de aproximativ 50 %.

- Pentru semnalul ELEC se plasează pe suprafața platformei de imunoanaliză, realizată conform invenției, sau se pompează dacă se utilizează o celulă de imunoanaliză în flux, o soluție de apă oxigenată de concentrație 1...10 mM și 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) de concentrație 0,3...5,0 mM preparată în tampon fosfat-citrat pH 5.0...6.0, și se aplică un potențial în domeniul -0.2...+0.2 V. În mod similar, se va înregistra semnalul amperometric care va fi notat $ELEC_{Ag+AgHRP}$ și va fi raportat la răspunsul obținut pentru imunosenzorul incubat numai cu soluție tampon, notat $ELEC_{blank}$, iar raportul $(ELEC_{Ag+AgHRP} - ELEC_{blank})/ELEC_{blank}$ va fi reprezentat în funcție de concentrația bioconjugatului C_{AgHRP} .
- b) Realizarea graficului de calibrare pentru micotoxina analizată, prin plasarea la suprafața platformei de imunoanaliză, realizată conform invenției, a unor soluții ce conțin cantități diferite de standard de micotoxină Ag în amestec cu concentrația optimă de bioconjugat AgHRP. După un timp de incubare de 20...40 min suprafața imunosenzorului este spălată prin clătire ușoară cu tampon fosfat sau, dacă imosenzorul este plasat într-o celulă în flux, prin pomparea soluției tampon cu ajutorul unei pompe. Ulterior se măsoară cele două semnale similar modulului prezentat mai sus și se reprezintă astfel:
- Semnalul SPR înregistrat pentru fiecare concentrație de micotoxină standard, notat SPR_{Ag} , va fi raportat la semnalul obținut pentru imunosenzorul incubat numai cu soluție tampon, SPR_{blank} . Graficul de calibrare SPR se obține prin reprezentarea grafică a raportului $(SPR_{Ag} - SPR_{blank})/SPR_{blank}$ în funcție de concentrația micotoxinei standard, și se fitează, de asemenea, conform unei ecuații logistice cu patru parametri.
 - Semnalul ELEC înregistrat pentru fiecare concentrație de micotoxină standard, notat $ELEC_{Ag}$, va fi raportat la semnalul obținut pentru imunosenzorul incubat numai cu soluție tampon, $ELEC_{blank}$. Graficul de calibrare ELEC se obține prin reprezentarea grafică a raportului $(ELEC_{Ag} - ELEC_{blank})/ELEC_{blank}$ în funcție de concentrația micotoxinei standard, și se fitează conform unei ecuații logistice cu patru parametri.

Analiza unei probe ce conține o cantitate necunoscută de micotoxină se realizează prin plasarea soluției de probă în care a fost adăugat bioconjugat AgHRP, în concentrația găsită a fi optimă, la suprafața platformei imunoanalitice realizată conform invenției. După un timp de incubare de 20...40 min suprafața imunosenzorului este spălată prin clătire ușoară cu tampon fosfat sau, dacă imunosenzorul este plasat într-o celulă în flux, prin pomparea soluției tampon cu

ajutorul unei pompe. Ulterior se măsoară cele două semnale analitice, SPR și ELEC, similar modului prezentat mai sus, iar concentrația micotoxinei este calculată prin interpolare pe graficele de calibrare corespunzătoare.

Avantajele acestei invenții sunt următoarele:

- Materialul reprezentat de filmul polimeric de 2,6-dihidroxinaftalină și 2-(4-aminofenil)-etilamină în care este înglobat anticorpul specific micotoxinei țintă, electrodepus prin voltametrie ciclică pe suprafața activă a unui electrod de lucru format dintr-un film de aur realizat pe suport de sticlă este imunosenzitiv atât pentru detecția electrochimică (ELEC), cât și a rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR), procesul de imuno-recunoaștere putând fi monitorizat cvasi-simultan prin cele două tehnici diferite de detecție .
- Procedul de obținere a filmului polimeric electrodepus de 2,6-dihidroxinaftalină și 2-(4-aminofenil)-etilamină încorporând anticorpul micotoxinei țintă este simplu și reproductibil, proprietățile filmului putând fi ușor controlate prin intermediul parametrilor de electrodepunere, iar prețul de cost este scăzut.
- Metoda de analiză a micotoxinelor utilizând materialul imunosenzitiv și platforma combinată de detecție este mai precis și mai sigur datorită faptului că se bazează pe două semnale analitice diferite.
- Platforma combinată de detecție a micotoxinelor prin utilizarea platformei de imunoanaliză prezintă caracteristici de operare intuitive simple, prietenoase, fiind special concepută pentru o utilizare nespecialistă, în concordanță cu prețurile reale ale produselor similare de pe piață.
- Metoda de determinare a micotoxinelor bazată pe detecția electrochimică combinată cu SPR utilizând platforma de imunoanaliză, realizată conform invenției, poate fi utilizată pentru probe biologice complexe nefiind necesară purificarea avansată a acestora.

În continuare, în legătură cu Fig. 1....5 este prezentat un exemplu privind modul de aplicare a invenției, fără a exista o limitare doar la acesta.

Exemplul 1

Un film copolimeric de 2,6-dihidroxinaftalină și 2-(4-aminofenil)-etilamină a fost electrodepus pe un electrod de lucru reprezentat de un film de aur depus pe suport de sticlă prin plasarea pe suprafața electroactivă a acestuia a 200 μ L soluție de 2,6-dihidroxinaftalină cu concentrația de 0,5...5,0 mM și 2-(4-aminofenil)-etilamină cu concentrația de 1,0....14 mM preparată în tampon fosfat salin pH 7,4, concentrație 100 mM, conținând anticorpul specific aflatoxinei M1, anti-aflatoxina M1, de concentrație 20 μ g/mL și glutaraldehidă 0,002...0,05%.

Filmul polimeric a fost depus prin realizarea unor cicluri de scanare a potențialului în domeniul 0 V – 1,2 V vs Ag/AgCl, cu o viteză de scanare de 20 mV/sec până la înregistrarea unei valori constante a curentului pentru câteva cicluri succesive utilizând un potentiostat/galvanostat.

Figura 1 prezintă voltamogramele ciclice înregistrate pentru electrodepunerea filmului imunosenzitiv pe suprafața electrodului de lucru a platformei de imunoanaliză combinată ELEC-SPR. Se observă încă de la început prezenta unui pic de oxidare și unul de reducere care pot fi atribuite grupărilor amino de pe suprafața filmului poli(AP-EA-DHN) care permit legarea covalentă a anti-aflatoxinei M1 prin formarea legăturilor peptidice. Prin copolimerizarea celor doi monomeri, AP-EA și DHN, se asigură o stabilitate crescută a filmului sintetizat pe suprafața senzorului, precum și menținerea prezentei grupărilor amino în structura polimerului.

Drept bioconjugat AFM1-HRP a fost utilizat conjugatul dintr-un kit comercial de analiză a aflatoxinei M1 (AFM1) produs de R-Biopharm (Germania). Pentru determinarea concentrației (diluției) optime de bioconjugat pentru cele două tipuri de semnale au fost realizate amestecuri din Tabelul 1.

Tabel 1. Compoziție soluții pentru identificarea concentrației (diluției) optime de bioconjugat

Diluție bioconjugat	Volum bioconjugat (μL)	Volum soluție AFM1 de concentrație 5 ng/mL (μL)	Volum tampon fosfat salin 100 mM, pH 7.4 (μL)
1/500	1	5	494
1/250	2	5	493
1/200	2,5	5	492,5
1/100	5	5	490
1/50	10	5	485
1/40	12,5	5	482,5
1/25	20	5	475
1/20	25	5	470

În Figurile 2 și 3 sunt prezentate graficele obținute pentru determinarea diluției optime de lucru a bioconjugatului, pentru detecția SPR și, respectiv, ELEC. Condițiile de determinare a celor două tipuri de semnale sunt conform celor descrise în cadrul invenției. Ambele metode de detecție au arătat că diluția optimă a conjugatului este de 1/75. Folosind această diluție optimă au fost realizate graficele de calibrare pentru AFM1 din Figurile 4 și respectiv 5, folosind platforma de imunoanaliză realizată conform invenției și cele două tipuri de detecție.

REVEDICĂRI

1. Procedeu de obtinere a unei platforme de imunoanaliză pentru determinarea selectivă a micotoxinelor bazată pe un material imunosenzitiv, **caracterizat prin aceea ca** un film polimeric este electrodepus pe un electrod de lucru format dintr-un film de aur depus pe un strat de sticlă sau cuarț, dintr-o soluție 2,6-dioxidinaftalină cu concentrație de 0,5...5mM, 2-(4-aminofenil)-etilamină cu concentrație de 1,0...14mM, anticorp anti-micotoxina 10...100 μg/mL și glutaraldehidă 0,002...0,05% prin realizarea unui număr de 10...40 cicluri cu o viteză de scanare de 2...50 mV/sec în intervalul (-0,5...0,1)V – (0,8...1,2)V.
2. Metodă de analiză a micotoxinelor din probe lichide, **caracterizat prin aceea că** proba lichida de analizat ce conține micotoxina țintă și o concentrație optimă de bioconjugat micotoxină - peroxidază din hrean (HRP), în tampon fosfat salin pH 7.4, se plasează pe materialul imunosenzitiv al platformei de imunoanaliză realizată conform **Revedicării 1**, și după o perioadă de incubare de 20...40 min, proba se îndepărtează, iar concentrația de micotoxină se determină cvasi-simulan, atât în mod direct prin măsurarea rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) a cărei valoare va fi invers proporțională cu concentrația micotoxinei din probă, cât și indirect prin tehnica electrochimică (ELEC) ce constă în determinarea amperometrică a activității HRP din bioconjugatul legat la anticorpul imobilizat în materialul imunosenzitiv, pe baza reacției catalizată de HRP dintre apa oxigenată de concentrație 1...10 mM și 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) de concentrație 0,3...5,0 mM în tampon fosfat-citrat pH 5.0...6.0, la potențiale aplicate în domeniul -0.2...+0.2 V, răspunsul amperometric al platformei combinate de imunoanaliză fiind de asemenea invers proporțional cu concentrația de micotoxină din probă.

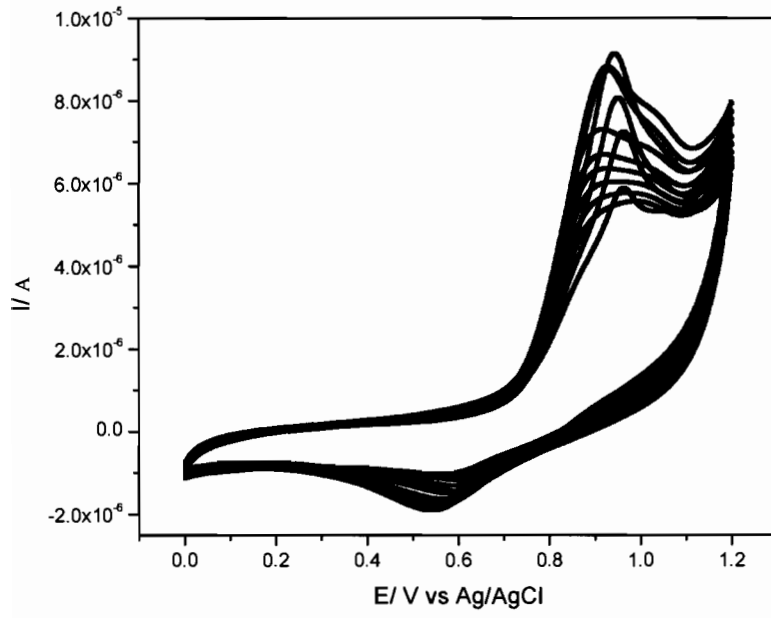


Fig. 1

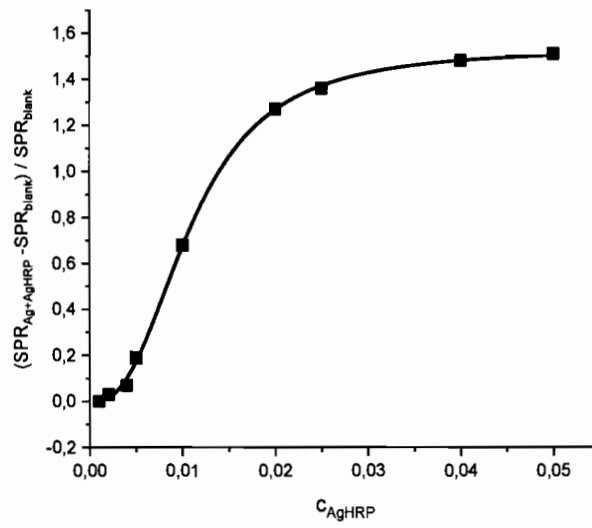


Fig. 2

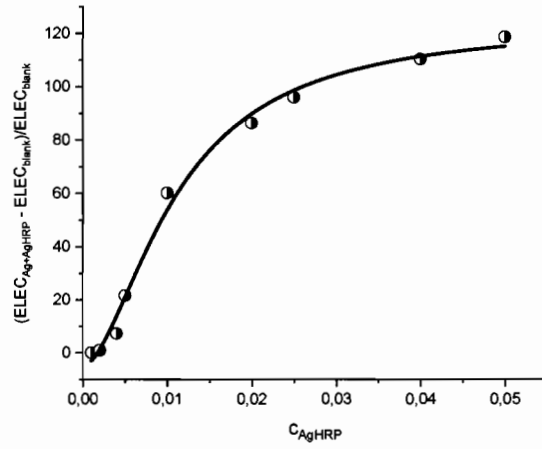


Fig. 3

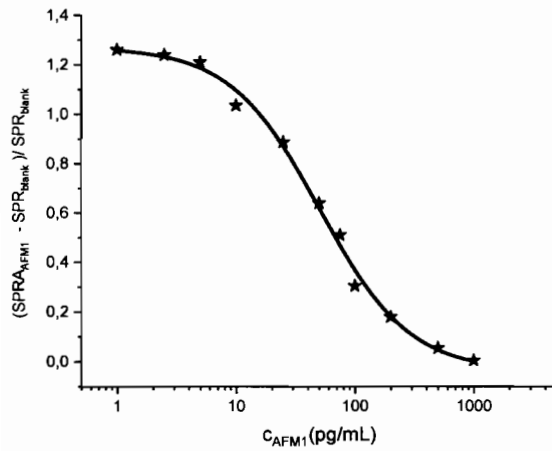


Fig. 4

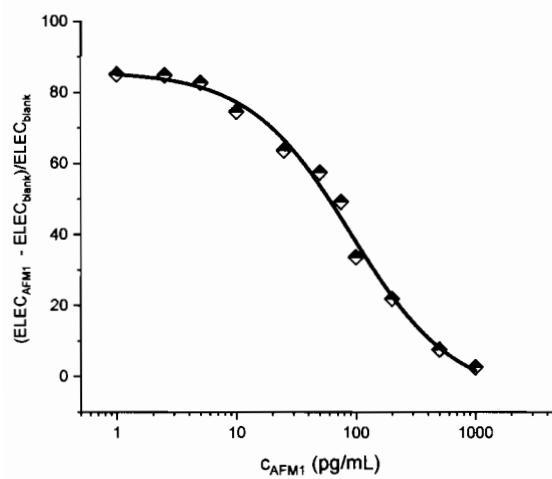


Fig. 5