

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 666**

51 Int. Cl.:

G01T 1/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/EP2014/073091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14789576 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 3063557**

54 Título: **Método dosimétrico**

30 Prioridad:

28.10.2013 EP 13190516

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

13.11.2017

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2 Shimohozumi
Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**DE VISSCHER, GEOFFREY y
SCHÜWER, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 641 666 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 dosimétrico

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante y a aplicaciones del mismo. Más particularmente, la invención se refiere a la detección y cuantificación opcional de la exposición a radiación ionizante monitorizando cambios de propiedades en compuestos de dianhidrohexitol que se han expuesto a radiación ionizante.

10 **2. Antecedentes de la invención**

La radiación ionizante se emplea en una amplia variedad de procesos médicos, industriales y agrícolas. Algunos procesos típicos incluyen terapia con radiación de materia o sujetos biológicos (por ejemplo, personas, animales, sangre), alteración de propiedades de materiales (por ejemplo, polimerización, reticulación), control de calidad (por ejemplo, inspección de soldaduras, medición del grosor de obleas microelectrónicas), análisis de seguridad (por ejemplo, detectores de rayos X), irradiación de alimentos y cultivos (por ejemplo, para clasificar y seleccionar alimentos, mantener las propiedades deseadas o eliminar plagas), así como la esterilización de materiales en general. La exposición a radiación ionizante también puede producirse de manera natural (por ejemplo, gas radón), accidentalmente (por ejemplo, vertido radiactivo) o como parte de los riesgos laborales aceptados de determinadas profesiones (por ejemplo, mineros, radiólogos, tecnólogos médicos, operarios de centrales nucleares, científicos investigadores, pilotos y tripulación de cabina). Independientemente de cómo se exponga una persona o un objeto a radiación ionizante, a menudo existe la necesidad de verificar que se ha producido exposición y cuantificar esa exposición, ya sea de carácter agudo o crónico.

Los dosímetros de radiación se usan para medir la exposición de un individuo o un objeto a radiación ionizante. Un dosímetro es un material o dispositivo que, cuando se expone a radiación ionizante, presenta un cambio cuantificable en una propiedad física o química del material o dispositivo que puede relacionarse con la dosis en un material dado usando las técnicas analíticas apropiadas.

Se han descrito varios materiales que presentan un cambio de propiedades dependiente de la dosis después de la exposición a radiación ionizante. Por ejemplo, el dosímetro de Fricke, también denominado dosímetro de sulfato ferroso, se basa en la oxidación de iones ferrosos (Fe^{2+}) a iones férricos (Fe^{3+}) en agua o geles acuosos con un cambio correspondiente en las propiedades paramagnéticas u ópticas que puede medirse usando velocidades de relajación en resonancia magnética nuclear (RMN) o técnicas ópticas. Una limitación importante de los sistemas basados en gel y basados en disolución de Fricke es la difusión tras la irradiación continua de iones, lo que da como resultado una distribución imprecisa de la dosis, particularmente cuando se usan estos para dosimetría tridimensional. Determinados materiales cristalinos (por ejemplo, fluoruro de calcio, fluoruro de litio) presentan termoluminiscencia en respuesta a radiación ionizante. A medida que la radiación interacciona con el cristal, hace que salten los electrones en los átomos del cristal a estados de energía más altos, en los que quedan atrapados debido a impurezas introducidas de manera intencionada en el cristal. El calentamiento del cristal hace que los electrones excitados vuelvan a su estado fundamental, con lo cual se libera un fotón y puede detectarse. Puesto que los electrones excitados tienden a volver a su estado fundamental con el tiempo (denominado desvanecimiento, *fading*), los materiales con termoluminiscencia presentan una vida útil limitada después de la cual ya no puede obtenerse información dosimétrica. Otro material adecuado para dosimetría es la alanina, un aminoácido, que forma radicales tras la exposición a radiación ionizante (véase, por ejemplo, el documento US 2005/0061991 A1). Los radicales que se producen son estables durante al menos varias horas. Esto se debe principalmente a la inhibición de la recombinación entre radicales en la estructura cristalina del material con lo que se impide en gran medida la migración de fragmentos de moléculas grandes. La concentración de los radicales formados puede medirse usando un espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) para determinar la cantidad de radiación ionizante absorbida. Aunque la alanina se usa ampliamente como material para dosimetría, la detección de sus radicales requiere el uso de equipos caros y complicados. Materiales adicionales que se notifica que son adecuados para la dosimetría de radiación ionizante incluyen compuestos del tipo de diacetileno, que cambian de color y son sensibles a la radiación tales como $R-C\equiv C-C\equiv C-R'$ en los que R y R' son grupos sustituyentes (véase el documento US 8.115.182 B1), manitol (véase Scherz y Grünwald, Kerntechnik, 1970, v. 12(11), págs. 501-503), y colorantes leuco sensibles al ácido dispersos en un polímero que contiene halógeno (véase el documento US 5.206.118).

La presente invención tiene como objetivo abordar las desventajas asociadas con materiales y dispositivos dosimétricos conocidos tales como los descritos anteriormente.

60 **3. Sumario de la invención**

Esta invención proporciona un método para detectar y opcionalmente cuantificar una dosis de radiación ionizante. La invención se basa en el hallazgo de que se observa un cambio de color cuando se expone un dianhidrohexitol a radiación ionizante. El cambio de color es visible para el ojo humano. El cambio de color también puede observarse

usando técnicas colorimétricas, cromométricas o espectroscopía UV-Visible (UV-Vis). De manera más importante, se ha hallado que el cambio de color tiene una dependencia lineal de la dosificación de radiación. Esto permite que se correlacione el cambio de color con la cantidad de radiación ionizante absorbida por el material. En un aspecto, la presente invención prevé el uso de un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol para detectar o cuantificar la exposición a radiación ionizante, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante. Un método de la invención a modo de ejemplo puede comprender las etapas de: (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; (b) exponer el dianhidrohexitol a radiación ionizante, efectuando de ese modo un cambio de color en el dianhidrohexitol; (c) detectar el cambio de color en el dianhidrohexitol; y opcionalmente (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol basándose en el cambio de color.

Un método adicional que comprende las etapas de: (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; (b) exponer el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol a radiación ionizante, produciendo de ese modo un radical libre; (c) detectar un radical libre en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR); y opcionalmente (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol basándose en la señal de EPR.

En un aspecto adicional, la invención proporciona sistemas para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante. Un sistema de acuerdo con la invención comprende: un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; y medios para determinar si (i) el dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona kits para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante. Un kit de acuerdo con la invención comprende: un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; y medios para determinar si (i) el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.

En un ejemplo adicional útil para entender la invención, un procedimiento a modo de ejemplo comprende las etapas de: (a) proporcionar un objeto que va a esterilizarse; (b) exponer el objeto y un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol a radiación ionizante en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; (c) detectar el cambio de color en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol; (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol basándose en el cambio de color; (e) confirmar que la dosis es de 5 kGy o mayor, preferentemente de 20 kGy o mayor, más preferentemente de 25 kGy o mayor; y (f) marcar el objeto o envase que contiene el objeto para indicar que se ha esterilizado.

4. Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los espectros de absorbancia molar UV-Vis de isosorbida (en disolución acuosa) después de diferentes dosis de irradiación con rayos X.

La figura 2 representa la intensidad de la absorbancia molar UV-Vis a 263 nm para isosorbida (en disolución acuosa) después de diferentes dosis de irradiación con rayos X.

La figura 3 representa la absorbancia molar a 263 nm después de la irradiación con rayos γ (25,4 kGy) de isosorbida tanto en forma sólida como líquida (disolución acuosa 1 M).

La figura 4 representa el espectro de EPR (registrado a 100K) de isosorbida (figura 4A), isoidida (figura 4B) e isomanida (figura 4C) después de la irradiación con rayos γ (cada una expuesta a 26,7 kGy).

La figura 5 representa el espectro de EPR (registrado a 100K) para isosorbida después de irradiación con rayos X a 0 kGy (figura 5A, es decir, sin exposición), 5,6 kGy (figura 5B), 25,5 kGy (figura 5C) y 45,2 kGy (figura 5D).

5. Descripción detallada de la invención

Cuando se expone un dianhidrohexitol a radiación ionizante se observa un cambio de color. Por ejemplo, cuando se exponen isosorbida, isoidida o isomanida a irradiación con rayos X o rayos γ , se observa un cambio de color de blanco a naranja rosáceo pálido. La intensidad de este cambio de color aumenta a medida que lo hace la dosis de la

radiación. Si se disuelve el material expuesto, por ejemplo, en agua para formar una disolución acuosa y se examina con espectroscopía UV-Vis, puede observarse un nuevo pico a aproximadamente 263 nm para la isosorbida expuesta que no estaba presente antes (figura 1). También se observó un nuevo pico a aproximadamente 263 nm para isomanida e isoidida. Además, la intensidad de este pico aumenta linealmente con la dosificación de radiación (figura 2). Este cambio lineal en la intensidad es reproducible y se observa a través de un amplio intervalo de dosis de radiación. El cambio de color también es estable, después de 8 meses de almacenamiento a temperatura ambiente solamente se observó una disminución muy ligera de la intensidad del color y la intensidad de la absorbancia UV-Vis. Otros estudios han mostrado que el cambio de color es estable durante al menos 20 meses.

5.1 *Dianhidrohexitol*

Los dianhidrohexitoles (también conocidos como isohexidas) para su uso en la presente invención son isosorbida, isomanida e isoidida. El término "dianhidrohexitol" ha de entenderse que significa isosorbida, isomanida, o isoidida, ya se usen solas o como mezcla de dos o tres de estos isómeros. Isosorbida e isomanida son los dianhidrohexitoles preferidos para todos los aspectos de la presente invención, siendo la isosorbida el dianhidrohexitol más preferido de los tres. Estos compuestos están disponibles comercialmente y su síntesis se notifica ampliamente (por ejemplo, 13^a ed. Merck Index, entrada 5245; documentos GB 600870; US 3.160.641; US 3.023.223; WO 2013/125950 A1).

Para la presente invención, se prefiere que se use el dianhidrohexitol en forma pura para aumentar la sensibilidad del compuesto para detectar y opcionalmente cuantificar radiación ionizante. El dianhidrohexitol tiene preferentemente una pureza del 99 % en peso o más, y más preferentemente del 99,5 % en peso o más. Si el dianhidrohexitol es menos puro que esto existe una posibilidad aumentada de que esté presente una impureza que absorbe luz en el mismo intervalo de longitud de onda que se usa para detectar el cambio de color del dianhidrohexitol después de la exposición a radiación ionizante. Minimizando la cantidad de impureza, es posible aumentar la sensibilidad del compuesto para detectar y opcionalmente cuantificar radiación ionizante, particularmente cuando la impureza absorbe luz en el mismo intervalo de longitud de onda que se usa para detectar el cambio de color. Por ejemplo, la isosorbida que se usó para generar los datos en la figura 1 tenía una pureza del 99,5 % en peso. Puede observarse a partir de la figura 1 que la isosorbida absorbió escasa o ninguna cantidad de luz a 263 nm antes de la exposición ionizante (0 kGy), maximizando por tanto el cambio en el coeficiente de absorción después de las diversas exposiciones. Si el dianhidrohexitol que va a usarse en la invención es una mezcla de dos o tres de los isómeros isosorbida, isomanida o isoidida, entonces la pureza del 99 % en peso o más, o el 99,5 % en peso o más se refiere a la cantidad combinada de isosorbida, isomanida e isoidida. Cuando se usa EPR como medio para detectar y opcionalmente cuantificar radiación ionizante, entonces la presencia de impurezas que absorben luz tiene un menor impacto sobre la sensibilidad del método de detección y cuantificación opcional, particularmente cuando tales impurezas no impiden la detección o medición de la señal de EPR. En este caso, el dianhidrohexitol tiene preferentemente una pureza del 90 % en peso o más, preferentemente el 95 % en peso o más, más preferentemente el 99 % en peso o más, e incluso más preferentemente el 99,5 % en peso o más.

5.2 *Forma sólida así como líquida*

El dianhidrohexitol para su uso en la presente invención puede proporcionarse en forma de un sólido o un líquido. Por ejemplo, el dianhidrohexitol puede proporcionarse en forma de un polvo. También puede pensarse para dar gránulos, comprimidos, varillas, discos o perlas de cualquier forma o tamaño deseados. El dianhidrohexitol también puede disolverse en un disolvente adecuado tal como agua. A este respecto, se hace referencia a la figura 3 que muestra el cambio en la absorbancia a 263 nm después de la irradiación con rayos γ (25,4 kGy) de isosorbida tanto en forma sólida (polvo cristalino) como en forma líquida (disolución acuosa 1 M). Se detecta un cambio de color en ambos casos pero el cambio en intensidad es mayor para la forma sólida. Se prefiere que se proporcione el dianhidrohexitol en forma sólida para su uso en la presente invención. El término "forma sólida" significa que el dianhidrohexitol o la composición que comprende el dianhidrohexitol es un sólido (por ejemplo, gránulo, película, etc.). Se prefiere más que se proporcione el dianhidrohexitol en forma cristalina. El término "forma cristalina" engloba una composición que comprende cristales de dianhidrohexitol.

5.3 *Composición que comprende dianhidrohexitol*

El dianhidrohexitol puede usarse por sí mismo o con componentes adicionales (es decir, como una composición que contiene dianhidrohexitol). Por ejemplo, si el dianhidrohexitol va a pensarse para dar gránulos, comprimidos, varillas, discos o perlas, entonces pueden incluirse adyuvantes de preparación de comprimidos o de granulación, cargas, aglutinantes y similares en la composición. Cuando se eligen componentes adicionales, se prefiere que se elijan aquellos componentes que absorben escasa o ninguna cantidad de luz en el mismo intervalo de longitud de onda que se usa para detectar el cambio de color del dianhidrohexitol después de la exposición a radiación ionizante. Si se usan componentes adicionales, que absorben luz en el intervalo de longitud de onda de detección, tal absorción no debe alterarse con la irradiación. En este caso, dichos componentes adicionales pueden usarse como control interno. También se prefiere que se elijan componentes adicionales que no interfieran en la reacción de cambio de color del dianhidrohexitol tras la exposición a radiación ionizante. A modo de ejemplo, pueden usarse los siguientes componentes de aglutinante y carga en la presente invención: carbonato de calcio, sulfato de calcio, silicato de calcio, estearato de calcio, quitina, quitosano, fosfato de calcio dibásico dihidratado, palmitoestearato de

5 glicerilo, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearato de zinc, estearilfumarato de sodio, palmitato de ascorbilo, talco micronizado o no micronizado, sílice en diversas formas tales como sílice pirogénica, sílice coloidal y sílice precipitada y gel de sílice, silicato de aluminio y sodio, calcio mineral con ácido esteárico, monoestearato de glicerilo, triacetato de glicerilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), celulosa en polvo, celulosa microcristalina, maltodextrina, ácido octadecanoico, polietilenglicol, goma laca y especialmente goma laca purificada, esteatita, benzoato de sodio, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, ácido bórico, cloruro de sodio, aceite mineral y aceite vegetal hidrogenado, caolín, silicato de aluminio y magnesio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, y mezclas de dos o más cualesquiera de los mismos.

10 Cuando se proporciona el dianhidrohexitol en forma de una composición que contiene dianhidrohexitol, la cantidad total de dianhidrohexitol en la composición podría encontrarse por debajo del 99 % en peso cuando se incluyen componentes adicionales. No obstante, todavía se prefiere que se use un dianhidrohexitol que tenga una pureza del 99 % en peso o más, y más preferentemente el 99,5 % en peso o más para preparar la composición que contiene dianhidrohexitol: esto garantiza que cualquier impureza en el dianhidrohexitol se mantiene al mínimo, aumentando de ese modo la sensibilidad de toda la composición para detectar y opcionalmente cuantificar radiación ionizante. La cantidad total de dianhidrohexitol en la composición que contiene dianhidrohexitol es preferentemente de al menos el 50 % en peso, más preferentemente al menos el 80 % en peso e incluso más preferentemente al menos el 90 % en peso basado en el peso de toda la composición.

20 Haciendo referencia de nuevo a la técnica anterior, cuando se usa alanina como dosímetro, un elemento clave en la elección de componentes adicionales (tales como un aglutinante o una carga) es que el componente adicional no debe formar radicales libres que interferirían en la señal de EPR de alanina después de la exposición a radiación ionizante. La presente invención supera este problema en un aspecto porque la dosis de radiación ionizante puede determinarse mediante medios visuales o colorimétricos que evitan totalmente este problema. Esto aumenta enormemente la elección de componentes adicionales que pueden usarse junto con el dianhidrohexitol en comparación con los dosímetros tradicionales basados en alanina. Esto aumenta enormemente, a su vez, las formas sólidas y líquidas en las que puede proporcionarse el dianhidrohexitol.

30 La presente invención es particularmente adecuada para dosimetría con película así como dosimetría bidimensional (2D) y tridimensional (3D). En este caso, la composición que comprende el dianhidrohexitol contiene al menos un polímero como componente adicional. Por ejemplo, la composición puede formarse a partir de un polímero translúcido o transparente que contiene un dianhidrohexitol que se dispersa de manera homogénea y uniforme en el mismo. Tras la exposición a radiación ionizante, puede observarse un cambio de color en el polímero. En este sentido, el término "transparente o translúcido" significa que el polímero puede examinarse visualmente o mediante cualquier medio colorimétrico, cromométrico o de espectroscopía UV-Vis para determinar si una parte exterior o interior del polímero se ha sometido a radiación ionizante. El mapa dosimétrico 2D o 3D así formado es representativo del campo de energía al que se ha expuesto el polímero y puede cuantificarse a alta resolución espacial, proporcionando de ese modo un registro preciso, estable y almacenable en dos y tres dimensiones de la exposición a radiación.

40 El polímero transparente o translúcido puede seleccionarse de un conjunto de materiales poliméricos conocidos generalmente como plásticos ópticos. Este conjunto de materiales incluye, pero no se limita a, materiales acrílicos (por ejemplo: poliacrilonitrilo, y la familia de de ionómeros de etileno/ácido metacrílico conocidos como Surlyns™), poliestireno (conocido como Dylene™, Styron™ y Lustrex™), poliacetal (conocido como Delrin™ y Ultraform™), copolímero de olefina cíclica (COC, conocido como Topaz™ y Zeonor™), policarbonato (conocido como Lexan™ y Merlon™), resinas epoxídicas, siliconas y siloxanos, polimetilpenteno (TPX™), poliéster (conocido como Mylar™), polisulfona (conocida como Udel™) y poliuretano. Este conjunto de materiales también incluye copolímeros (por ejemplo, estireno-acrilonitrilo, conocido como Lustran™ y Tyril™), terpolímeros (por ejemplo, acrilonitrilo, butadieno, estireno), y combinaciones de dos o más plásticos ópticos. Se prefieren como polímeros el poliestireno y copolímeros de estireno. Como antes, cuando se elige un polímero como componente adicional en la composición se prefiere que se elija un polímero que absorbe escasa o ninguna cantidad de luz en el mismo intervalo de longitud de onda que se usa para detectar el cambio de color del dianhidrohexitol después de la exposición a radiación ionizante.

55 La composición que comprende el polímero y dianhidrohexitol puede fabricarse, por ejemplo, mezclando y dispersando uniformemente un dianhidrohexitol (por ejemplo, isosorbida cristalina) en una masa fundida del polímero seguido por una etapa de enfriamiento y solidificación dentro de un molde para proporcionar un producto moldeado sólido. El polímero puede extruirse en estado fundido para formar películas o fibras o cualquier otra forma deseada. El dianhidrohexitol puede proporcionarse en forma de una tarjeta, cinta o material textil (por ejemplo, tejido o no tejido).

65 Alternativamente, la composición que comprende el polímero y dianhidrohexitol puede fabricarse mezclando y dispersando uniformemente un dianhidrohexitol (por ejemplo, isosorbida cristalina) en una disolución del polímero en un disolvente apropiado, seguido por etapas de evaporación y solidificación dentro de un molde para proporcionar el producto moldeado sólido. En el caso de una película, la mezcla puede recubrirse en primer lugar sobre un sustrato adecuado antes de la evaporación de la disolución. Alternativamente, uno o más precursores químicos del producto

polimérico, tales como monómeros, se mezclan con el dianhidrohexitol y, si es necesario, uno o más catalizadores de polimerización, para proporcionar una mezcla que se coloca en moldes o se recubre sobre un sustrato y se permite que polimerice en condiciones controladas, proporcionando de ese modo el dianhidrohexitol en forma sólida.

5 Si se proporciona en forma sólida, el dianhidrohexitol o la composición que comprende un dianhidrohexitol puede sellarse con respecto al entorno. Los medios de sellado deben ser tales que permitan que penetre la radiación ionizante en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol. El sellado con respecto al entorno proporciona resistencia a la contaminación y sirve para proteger el dianhidrohexitol (o la composición que contiene dianhidrohexitol) frente a la exposición a humedad excesiva. Esto puede ser ventajoso si el dianhidrohexitol se usa para cuantificar radiación ionizante puesto que mejora la precisión y fiabilidad de los resultados finales ya que se reduce la contaminación (por ejemplo, absorción de agua). La protección puede ser en forma de un recipiente tal como una ampolla de vidrio o de plástico siempre que las paredes del recipiente permitan que pase la radiación ionizante al interior del recipiente. La protección puede ser en forma de un envase o una capa de recubrimiento superior protectora. Si está presente, un requisito principal del envase o la capa de recubrimiento superior es que permita la penetración de la radiación ionizante en el dianhidrohexitol (o la composición que contiene dianhidrohexitol). Si la capa de recubrimiento superior no es translúcida o transparente a la luz visible, se retira después de la exposición ionizante de modo que pueda inspeccionarse el cambio de color. Los polímeros típicos para la capa de recubrimiento superior incluyen acrilatos, metacrilatos, materiales celulósicos tales como acetato de celulosa, poliésteres, poliuretanos y polímeros y copolímeros que contienen halógeno. Si se proporciona el dianhidrohexitol como una disolución, entonces se prefiere que el recipiente o envase que contiene la disolución se selle para reducir la evaporación del disolvente.

El dianhidrohexitol, o la composición que comprende un dianhidrohexitol, puede disponerse o diseñarse para crear un mensaje con palabras, símbolos, códigos u otros patrones para alertar a un usuario de que se ha producido una exposición a radiación ionizante.

5.4 Método para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición

Un método para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante comprende las etapas de (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; (b) exponer el dianhidrohexitol a radiación ionizante, efectuando de ese modo un cambio de color en el dianhidrohexitol; (c) detectar el cambio de color en el dianhidrohexitol; y opcionalmente (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol basándose en el cambio de color.

Un método adicional para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante, comprende las etapas de: (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; (b) exponer el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol a radiación ionizante, produciendo de ese modo un radical libre; (c) detectar un radical libre en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR); y opcionalmente (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol basándose en la señal de EPR.

El dianhidrohexitol puede proporcionarse por sí mismo o como parte de una composición tal como se describió previamente. El dianhidrohexitol preferentemente es isosorbida, lo más preferentemente en forma cristalina. La radiación ionizante que se detecta y/o cuantifica incluye rayos X, rayos γ , neutrones, partículas alfa, partículas beta, y otras partículas cargadas (por ejemplo, protones para radioterapia). La cantidad de radiación ionizante a la que se expone el dianhidrohexitol no está limitada siempre que pueda observarse un cambio de color. La figura 2 muestra que se observa un cambio lineal en la intensidad de color a través de un amplio intervalo de dosis de radiación. El dianhidrohexitol de la invención se usa preferentemente para detectar radiación ionizante a una dosis de 500 Gy y más. Más preferentemente, el dianhidrohexitol de la invención se usa para detectar radiación ionizante a una dosis de 1 kGy a 100 kGy, preferentemente de 5 kGy a 75 kGy, más preferentemente de 15 kGy a 50 kGy, y más preferentemente de 25 kGy a 40 kGy. Cuando se usa en un proceso de esterilización, el dianhidrohexitol de la invención se usa para detectar una cantidad de radiación ionizante suficiente para provocar la esterilización, normalmente 25 kGy y más.

El dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se coloca en, sobre o cerca de un objeto cuya exposición a radiación ionizante va a detectarse o monitorizarse. Si es necesario, pueden colocarse múltiples dosímetros en, sobre o cerca de (por ejemplo, alrededor de) el objeto. Por ejemplo, en el caso en que va a esterilizarse un palé de artículos, el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol puede colocarse hacia el centro del palé así como en la periferia del palé. En el caso de una persona o un animal, la composición que contiene dianhidrohexitol puede incorporarse en una tarjeta, cinta o material textil que va a llevar puesto esa persona o animal.

Cuando el dianhidrohexitol se expone a radiación ionizante, se observa un cambio de color. En la presente invención el término "cambio de color" engloba la aparición, desaparición o el desplazamiento de una banda de absorción en la

región de de 220 nm a 600 nm, así como el aumento o la disminución del coeficiente de extinción para cualquier longitud de onda en la región de 220 nm a 600 nm. Por ejemplo, haciendo referencia a la figura 1, la aparición de una banda a 263 nm después de una dosis de 5,2 kGy de radiación ionizante representa un cambio de color de acuerdo con la invención. El aumento del coeficiente de extinción de la banda a 263 nm para dosis progresivamente mayores de radiación ionizante también representa un cambio de color. Aunque la banda de absorción en la figura 1 tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ aproximadamente a 263 nm, esta puede desplazarse dependiendo del disolvente usado o la forma (por ejemplo, película de polímero) del dianhidrohexitol. Si se usa un dispositivo tal como un espectrómetro UV-Vis, dispositivo colorimétrico o cromométrico para detectar el cambio de color, entonces puede detectarse el cambio de color en cualquier lugar en la región de 220 nm a 600 nm, preferentemente de 230 nm a 400 nm, más preferentemente de 240 nm a 300 nm, e incluso más preferentemente de 250 nm a 270 nm. De acuerdo con un modo de realización preferido, detectar el cambio de color significa determinar el cambio en el coeficiente de extinción a una longitud de onda predeterminada seleccionada dentro de uno de los intervalos de longitud de onda anteriores. Naturalmente, si el cambio de color se detecta visualmente, entonces el cambio de color se detecta en el espectro visual.

El cambio en el color puede detectarse mediante cualquier medio que sea capaz de detectar la aparición, desaparición o el desplazamiento de una banda de absorción en la región de 220 nm a 600 nm, o el aumento o la disminución del coeficiente de extinción para cualquier longitud de onda en la región de 220 nm a 600 nm. Por ejemplo, puede usarse un colorímetro triestímulo, un espectrofotómetro, un espectrocolorímetro o un densitómetro para monitorizar cambios en la longitud de onda en el espectro visible. Puede usarse un detector UV para monitorizar cambios en la longitud de onda en el espectro UV. Preferentemente, se usa un espectrómetro UV-Vis para monitorizar el cambio de color. El cambio en el color también puede detectarse visualmente, por ejemplo inspeccionando el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos. Alternativa o adicionalmente, la detección y cuantificación opcional de la exposición a radiación ionizante puede realizarse basándose en la aparición de una señal de resonancia paramagnética electrónica (EPR) después de la exposición del dianhidrohexitol a radiación ionizante.

El dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos pueden analizarse con sonda directamente para detectar el cambio de color o la señal de EPR. Por ejemplo, si el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol están en forma de un gránulo o una película, entonces puede analizarse con sonda directamente mediante un colorímetro triestímulo, un espectrofotómetro, un espectrocolorímetro, densitómetro o EPR. Alternativamente, el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol puede someterse a una o más etapas de procesamiento antes de la etapa de detección del cambio de color. Por ejemplo, el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol puede disolverse en un disolvente adecuado y, entonces analizarse con sonda tal como se comentó anteriormente.

Si el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se proporciona en una forma tal que se sella con respecto al entorno (por ejemplo, en un recipiente), entonces los medios de sellado pueden retirarse parcial o completamente para permitir la inspección o el procesamiento adicional del dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos. Si el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se proporciona en una forma sólida dentro un recipiente, después del procedimiento de irradiación puede añadirse una cantidad predefinida de disolvente al recipiente para disolver el dianhidrohexitol. Después de eso, puede tomarse una muestra de la disolución de dianhidrohexitol y examinarse mediante medios colorimétricos o cromométricos. Alternativamente, si las paredes del recipiente son transparentes a la luz en la región de longitud de onda de detección, entonces el recipiente puede estar en una forma adecuada (por ejemplo, una cubeta o un tubo) para la inserción directa en un dispositivo analítico colorimétrico tal como un dispositivo espectroscópico (por ejemplo, UV/Vis, colorimétrico, etc.) o de EPR. Se prefiere que el recipiente esté compuesto por un material que no experimenta un cambio de color cuando se expone a radiación ionizante. En otra realización, el recipiente sellado puede contener adicionalmente un disolvente que se separa del dianhidrohexitol durante el procedimiento de irradiación pero que se hace que entre en contacto con el dianhidrohexitol después del procedimiento de irradiación para disolverlo. Por ejemplo, puede almacenarse el dianhidrohexitol en una ampolla de vidrio cerrada que está contenida a su vez dentro de un recipiente flexible que contiene un disolvente. El doblado del recipiente flexible hace que se rompa la ampolla de vidrio de modo que el dianhidrohexitol se disuelve en el disolvente. Tal como se comentó anteriormente, entonces puede tomarse una muestra de la disolución de dianhidrohexitol y examinarse mediante medios colorimétricos, cromométricos o espectrométricos o alternativamente el recipiente puede insertarse directamente en un dispositivo analítico colorimétrico, cromométrico o espectrométrico UV-Vis. La ventaja de este sistema es que no es necesario que el usuario tome una alícuota de una cantidad predefinida de disolvente. Esto aumenta la comodidad y precisión de la medición.

La detección de un cambio de color significa que se ha producido una exposición a radiación ionizante. Para algunas aplicaciones, puede ser suficiente solamente esta información. La etapa de cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol se realiza comparando el cambio de color del dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos con una referencia. Se prepara una referencia sometiendo una muestra representativa del dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol a una dosis conocida de radiación ionizante y observando el cambio de color. Una muestra representativa es una muestra que se espera que absorba radiación ionizante en la misma medida que la muestra que está sometiéndose a prueba (por ejemplo, misma forma,

tamaño, densidad, etc.). El cambio de color de la muestra y la referencia pueden compararse directamente.

Alternativamente, el cambio de color de la referencia puede registrarse (por ejemplo, como uno o más puntos de datos UV-Vis, o usando el sistema Pantone de homologación de color, espacio de color Adobe RGB, espacios de color RGB y XYZ CIE 1931, y similares) para una comparación posterior con muestras en las que se desconoce la cantidad de radiación ionizante a la que se ha expuesto. Si la muestra que está sometiéndose a prueba presenta el color que la referencia, entonces puede suponerse que la muestra recibió la misma dosis de radiación que se usó para preparar la referencia. Si se usa un cambio en la señal de EPR para cuantificar la dosis de radiación ionizante, entonces puede compararse la señal con una señal de referencia de EPR. Este método es particularmente adecuado para determinar una dosis de exposición mínima. Por ejemplo, si la muestra que está sometiéndose a prueba presenta el mismo color o uno más intenso que la referencia (por ejemplo, mayor coeficiente de absorción, croma potenciando, etc.), entonces puede suponerse que la muestra recibió al menos la misma dosis que la referencia, si no más. Esto es particularmente útil cuando sólo se está interesado en determinar si se ha producido una exposición mínima predefinida (por ejemplo, seguridad de trabajadores, procedimientos de esterilización, etc.). Para los propósitos de esta invención, ha de entenderse que la etapa de cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol basándose en el cambio de color engloba la determinación de una exposición mínima predefinida.

El método de la presente invención también permite que se determine la cantidad de exposición a radiación ionizante. En este caso, puede exponerse una muestra representativa a una pluralidad de dosis crecientes de radiación ionizante. Alternativamente, se expone cada una de una pluralidad de muestras representativas a una dosis diferente de radiación ionizante. En ambos casos, la pluralidad de cambios de color que se observan puede usarse como referencia para determinar la cantidad de exposición ionizante para una muestra cuya exposición se desconoce. La pluralidad de cambios de color puede registrarse tal como se describió anteriormente (por ejemplo, como una carta de colores) o puede prepararse una curva de calibración (por ejemplo, véase la figura 2). El cambio de color de la muestra que está sometiéndose a prueba se compara con el cambio de color asociado con la dosis creciente de radiación ionizante para determinar la dosis real recibida.

La referencia puede ser una o más muestras que se han expuesto previamente a dosis predefinidas de radiación ionizante. Alternativamente, la referencia puede ser un registro de los cambios de color asociado con dosis predefinidas de radiación ionizante. Por ejemplo, la referencia puede ser una carta de colores o una tabla de datos que permite que se correlacione el cambio de color de una muestra expuesta con un nivel particular de exposición. Alternativamente, el registro puede almacenarse electrónicamente de tal manera que sea accesible (localmente o de manera remota) para cualquier dispositivo electrónico usado para detectar o cuantificar el cambio de color. Por ejemplo, si el dispositivo usado para detectar o cuantificar el cambio de color comprende una cámara, el dispositivo puede configurarse para comparar el cambio de color de la muestra (directamente o a partir de una imagen registrada) con el registro almacenado electrónicamente de modo que se permita una correlación del cambio de color de una muestra expuesta con un nivel particular de exposición.

5.5 Sistemas y kits

La invención también proporciona sistemas y kits para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante. Por ejemplo, la invención proporciona un sistema para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante que comprende: un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol; y medios para determinar si (i) el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.

El dianhidrohexitol es tal como se describió previamente y es preferentemente isosorbida. El dianhidrohexitol puede proporcionarse como parte de una composición. Los medios para determinar si el dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente la cantidad de exposición que se ha producido pueden ser una muestra representativa expuesta de manera previa. Alternativamente, el dianhidrohexitol, o la composición que comprende un dianhidrohexitol, puede disponerse o diseñarse para crear un mensaje con palabras, símbolos, códigos u otros patrones para alertar a un usuario de que se ha producido una exposición a radiación ionizante. Los medios pueden ser alternativamente un registro (por ejemplo, carta de colores o tabla de datos) que permite que un usuario correlacione un cambio de color con una exposición particular. Los medios también pueden ser un dispositivo colorimétrico, cromométrico, espectrométrico o de EPR tal como se describió anteriormente tal como un colorímetro triestímulo, un espectrofotómetro, un espectrocolorímetro, espectrómetro o un densitómetro opcionalmente conectado operativamente a un ordenador. Cuando se usa un ordenador como parte del sistema, puede usarse cualquier software disponible comercialmente o personalizado para detectar y opcionalmente cuantificar la dosificación de irradiación.

La invención también proporciona un kit que comprende un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol; y medios para determinar si el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente la cantidad de exposición que se ha producido. El dianhidrohexitol es tal como se describió previamente y es preferentemente isosorbida. El dianhidrohexitol puede proporcionarse como parte de una composición. Por ejemplo, el kit puede comprender un

dianhidrohexitol en forma de una pluralidad de gránulos, comprimidos, varillas, discos o perlas. El dianhidrohexitol puede proporcionarse en forma de una película, cinta, fibra, material textil o tarjeta. Los medios para determinar si el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente la cantidad de exposición que se ha producido pueden ser una muestra representativa expuesta de manera previa tal como se describió previamente y tal como se describió para el sistema anterior.

5.6 Esterilización

En un ejemplo adicional útil para entender la invención, un procedimiento a modo de ejemplo comprende las etapas de: (a) proporcionar un objeto que va a esterilizarse; (b) exponer el objeto y un dianhidrohexitol a radiación ionizante; (c) detectar el cambio de color en el dianhidrohexitol; (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol basándose en el cambio de color; (e) confirmar que la dosis es una cantidad predefinida adecuada para esterilización; y (f) marcar el objeto o envase que contiene el objeto para indicar que se ha esterilizado. El objeto puede esterilizarse y luego envasarse, o envasarse y luego esterilizarse. De cualquier modo, el producto obtenido directamente mediante el procedimiento es un objeto esterilizado envasado. El objeto esterilizado o el envase se marca para indicar que se esteriliza el objeto de modo que se evite cualquier confusión entre objetos esterilizados y no esterilizados. El objeto que va a esterilizarse puede ser un dispositivo médico o de investigación, un producto farmacéutico, un producto alimenticio o cualquier otro objeto que requiere esterilización.

6. Ventajas

En comparación con la tecnología existente tal como la que se mencionó anteriormente, los materiales basados en dianhidrohexitol no requieren ningún pretratamiento o activación específicos antes o después del uso y proporcionan un método visual, sencillo y directo para detectar y cuantificar la exposición a radiación ionizante sin requerir el uso de herramientas analíticas complejas (aunque estas pueden usarse no obstante) para la lectura de los resultados. El uso de isosorbida como dianhidrohexitol se prefiere particularmente para la presente invención ya que es un compuesto abundante, fácil de sintetizar y que se ha probado que no es tóxico.

7. Otras observaciones

Aunque se ha descrito generalmente la invención basándose en detectar un cambio de color en el dianhidrohexitol expuesto, este no es en modo alguno el único parámetro físico o químico que puede monitorizarse para determinar la exposición a radiación ionizante. Por ejemplo, y tal como se explicó anteriormente, la detección y cuantificación opcional de la exposición a radiación ionizante también puede realizarse basándose en la aparición de una señal de resonancia paramagnética electrónica (EPR) después de la exposición del dianhidrohexitol a radiación ionizante (véanse las figuras 4 y 5). Tales métodos de EPR los conocen los expertos en la técnica y se emplean ya para los dosímetros basados en alanina. Los sistemas y kits tal como se describen en el presente documento también pueden usarse para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante basándose en una señal de EPR. Se describen métodos y dosímetros basados en alanina que pueden modificarse para usar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, en los documentos US 2005/0061991 y EP 1 315 002 A1.

8. Aplicabilidad industrial

La presente invención puede usarse para detectar y cuantificar la exposición a radiación ionizante. La invención es adecuada para su uso en procesos médicos, industriales y agrícolas que requieren la monitorización de la exposición a radiación ionizante.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante, que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida;
- 10 (b) exponer el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol a radiación ionizante, efectuando de ese modo un cambio de color en el dianhidrohexitol;
- (c) detectar el cambio de color en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol; y opcionalmente
- 15 (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol basándose en el cambio de color.
2. Método para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante, que comprende las etapas de:
- 20 (a) proporcionar un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida;
- 25 (b) exponer el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol a radiación ionizante, produciendo de ese modo un radical libre;
- (c) detectar un radical libre en el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR); y opcionalmente
- 30 (d) cuantificar la dosis de radiación ionizante absorbida por el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol basándose en la señal de EPR.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección del cambio de color se realiza visualmente y el método comprende además la etapa de cuantificar la dosis de radiación ionizante comparando el cambio de color con una referencia para determinar (i) si se ha producido una exposición mínima predefinida y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.
- 35 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección del cambio de color se realiza con un dispositivo colorimétrico, cromométrico o espectrométrico y el método comprende además la etapa de cuantificar la dosis de radiación ionizante comparando el cambio de color con una referencia para determinar (i) si se ha producido una exposición mínima predefinida y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.
- 40 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dispositivo colorimétrico es un espectrómetro UV-Vis.
- 45 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 ó 5, en el que el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos se disuelve en un disolvente y la etapa de detección del cambio de color se realiza en una disolución del dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol expuestos.
- 50 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dianhidrohexitol es isosorbida.
- 55 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la radiación ionizante es rayos X o rayos γ .
9. Uso de un dianhidrohexitol para detectar o cuantificar la exposición a radiación ionizante, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida.
- 60 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dianhidrohexitol es isosorbida.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que la radiación ionizante es rayos X o rayos γ .
- 65 12. Sistema para detectar y opcionalmente cuantificar la exposición a radiación ionizante que comprende:

un dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida, e isoidida, y

medios adaptados para determinar si (i) el dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.

- 5
13. Kit que comprende:
- 10 un dianhidrohexitol o una composición que contiene dianhidrohexitol, en el que el dianhidrohexitol es uno o más de isosorbida, isomanida e isoidida; y
- medios adaptados para determinar si (i) el dianhidrohexitol o la composición que contiene dianhidrohexitol se ha expuesto a una dosis predefinida de radiación ionizante y opcionalmente (ii) la cantidad de exposición que se ha producido.
- 15 14. Kit de acuerdo con la reivindicación 13, que es para determinar si un objeto se ha esterilizado eficazmente, en el que los medios son una carta de colores y una dosis predefinida de radiación ionizante es la dosificación mínima requerida para una esterilización eficaz.
- 20 15. Kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la dosis predefinida de radiación ionizante es de 5 kGy o mayor, preferentemente de 20 kGy o mayor, más preferentemente de 25 kGy o mayor.

Figura 1

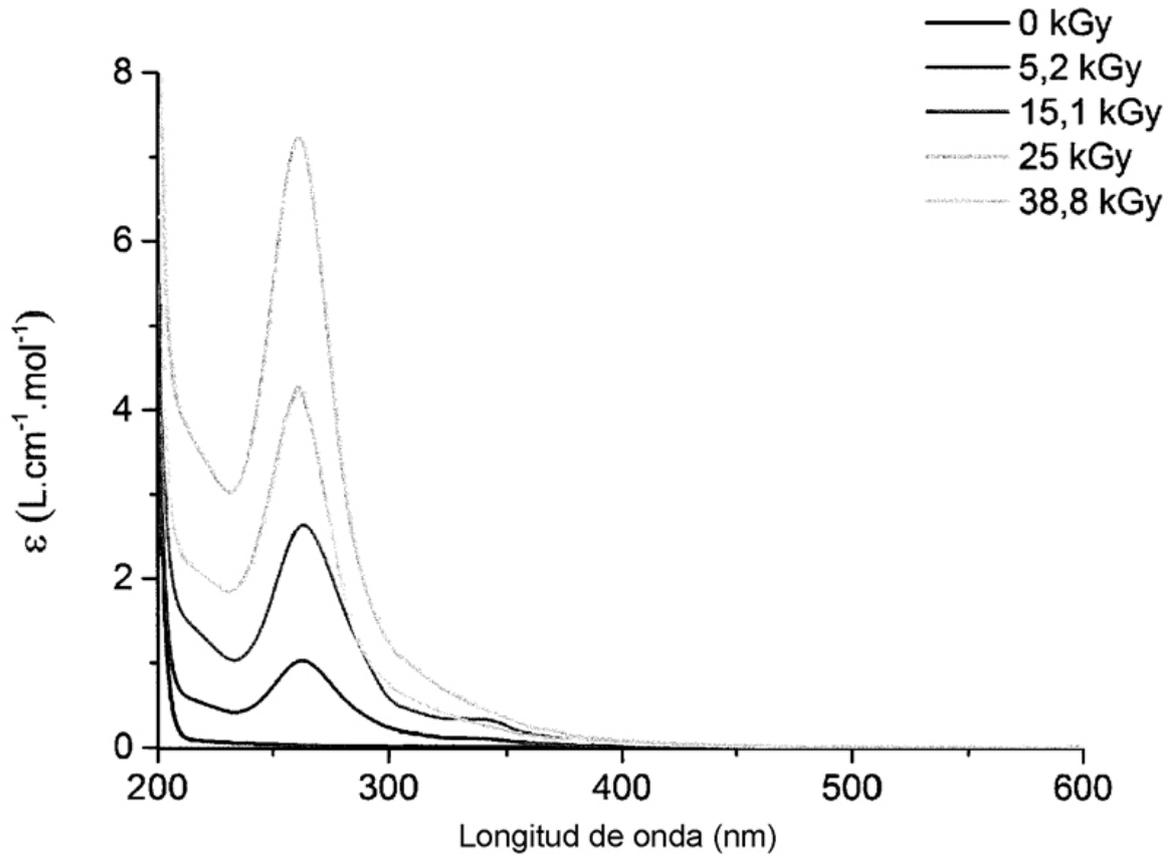


Figura 2

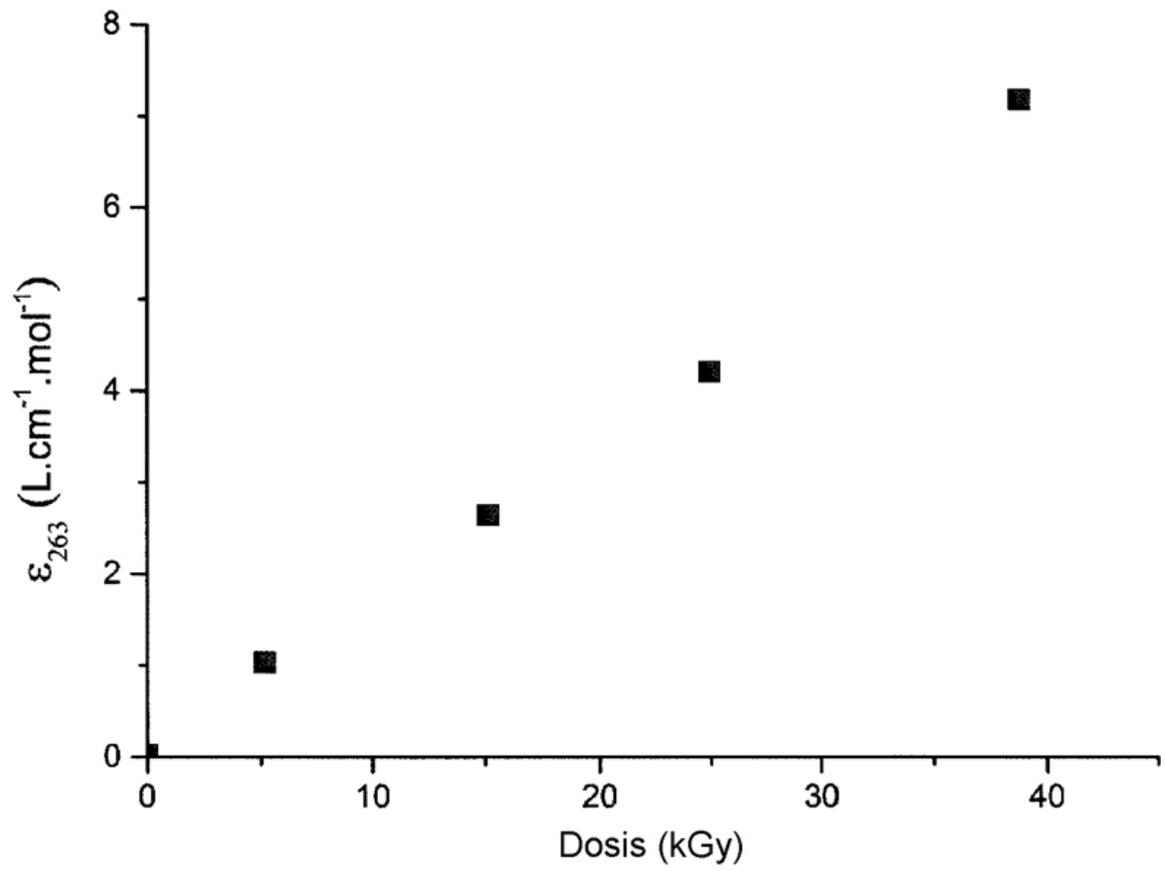


Figura 3

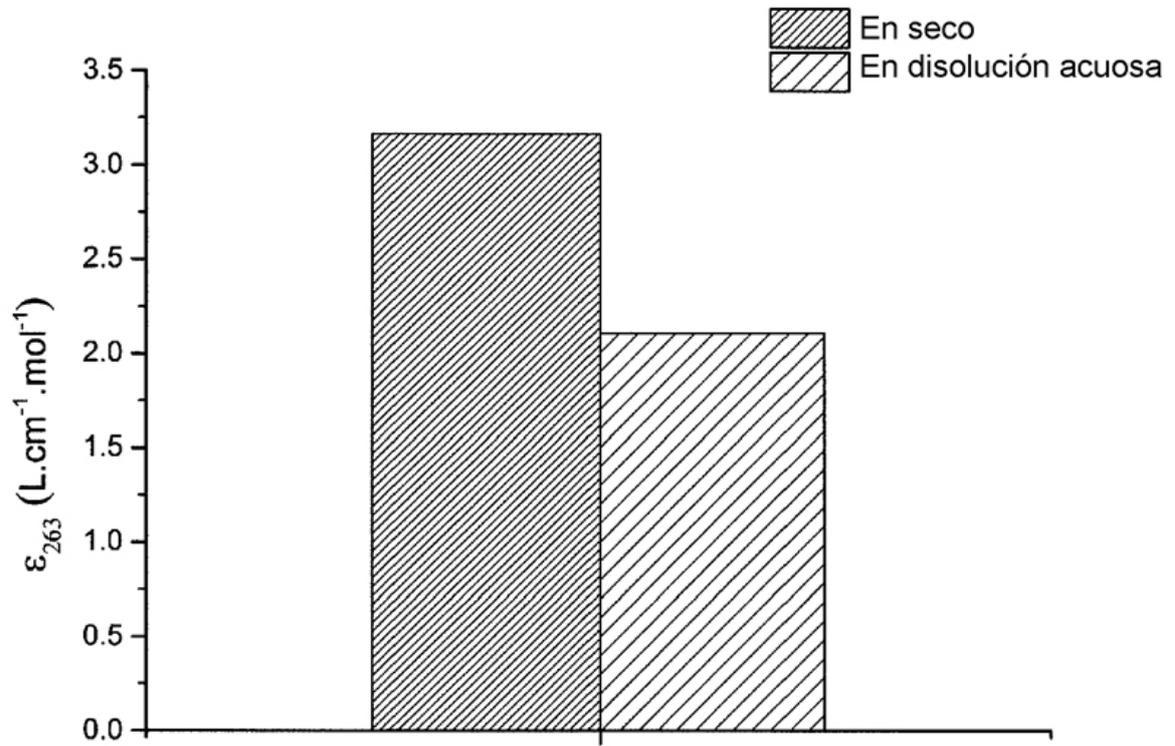


Figura 4A

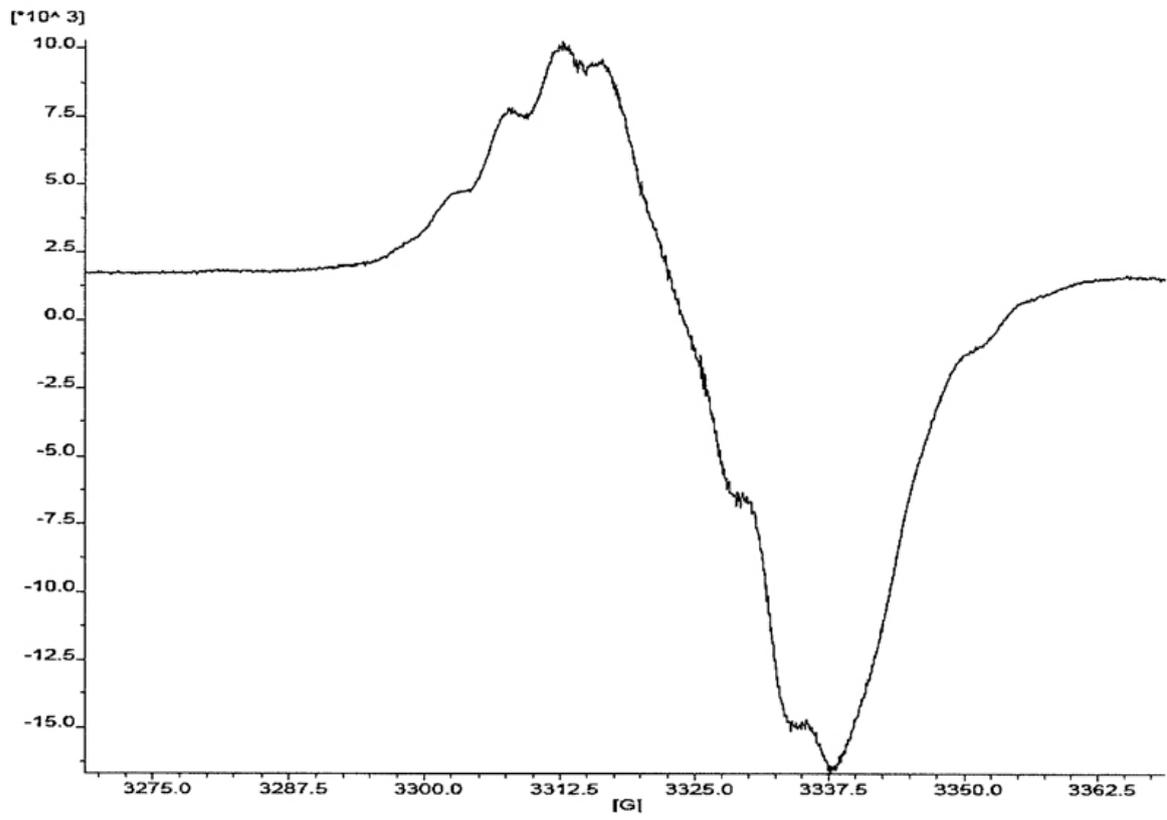


Figura 4B

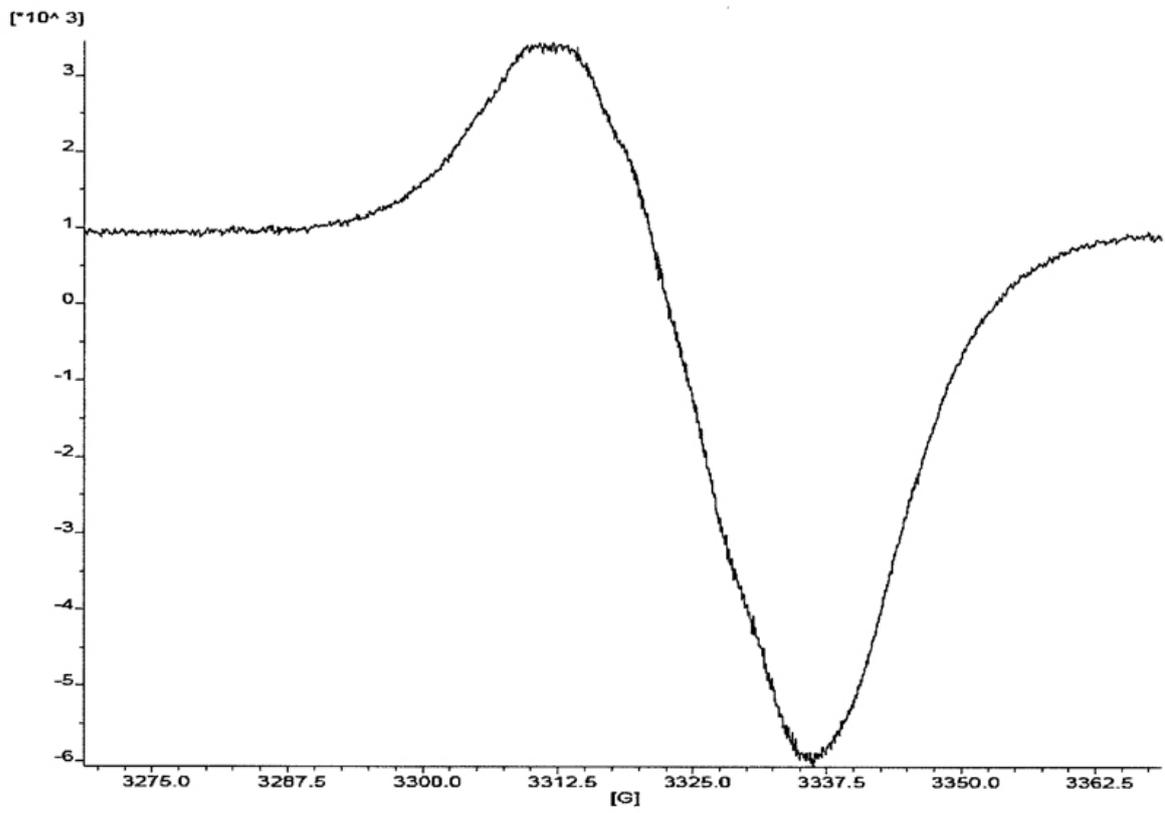


Figura 4C

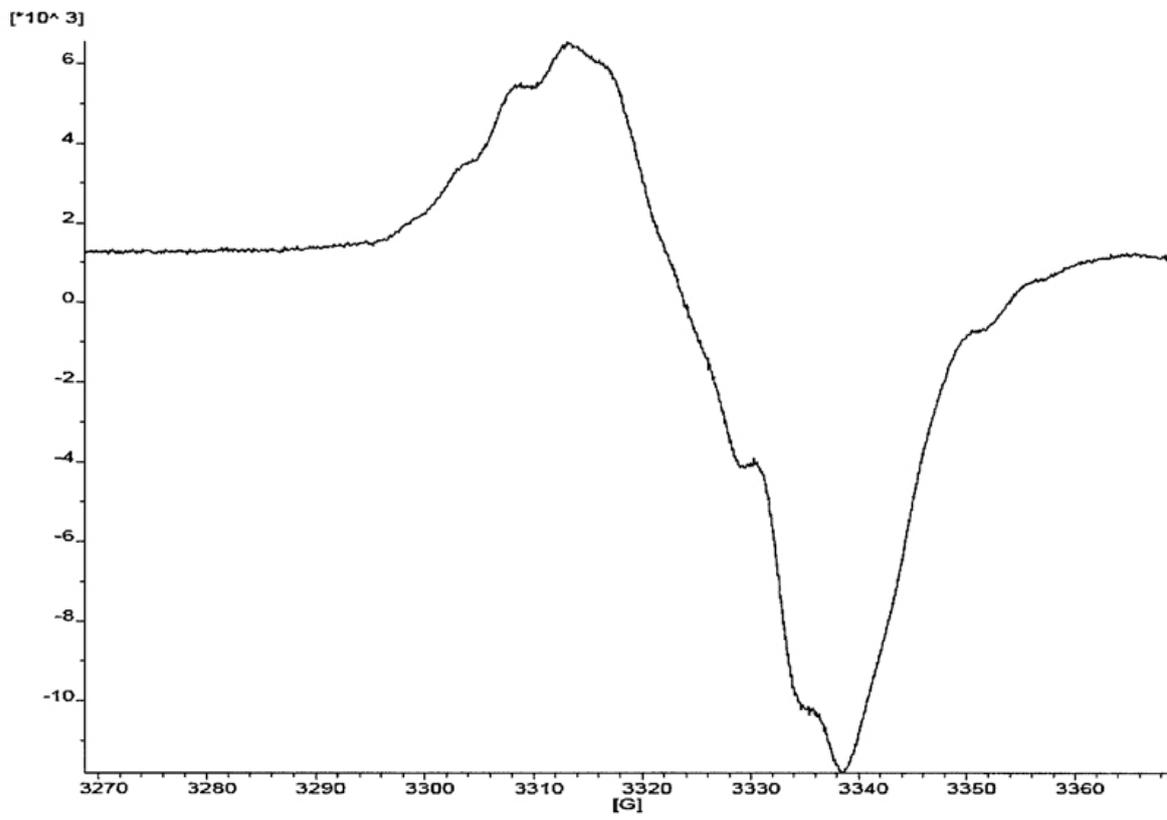


Figura 5A

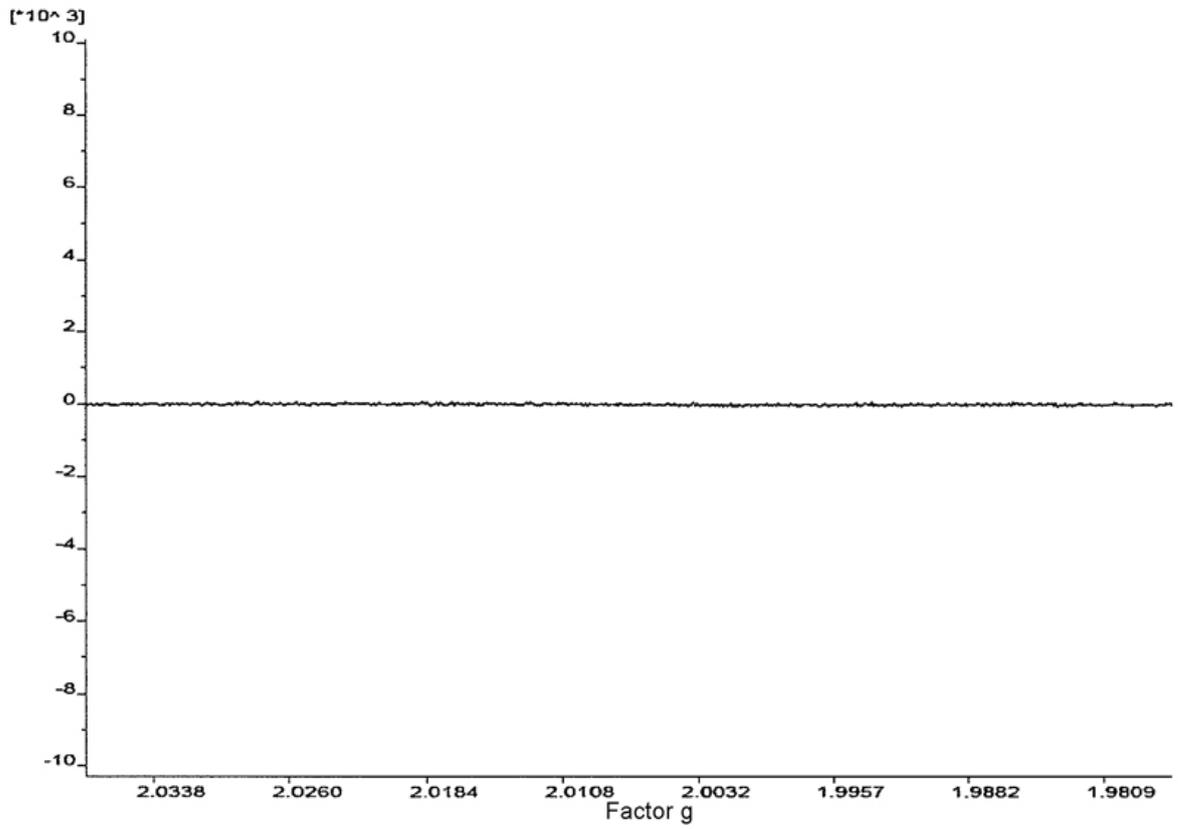


Figura 5B

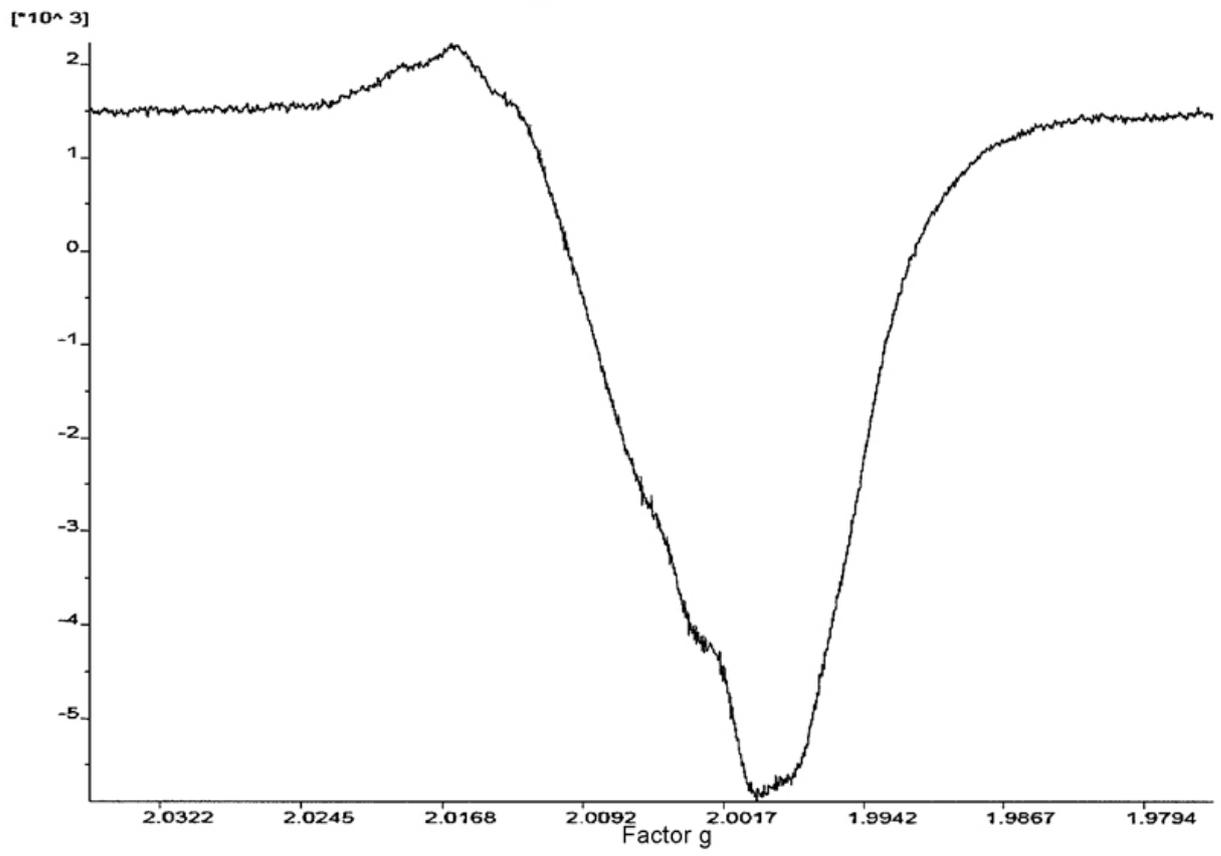


Figura 5C

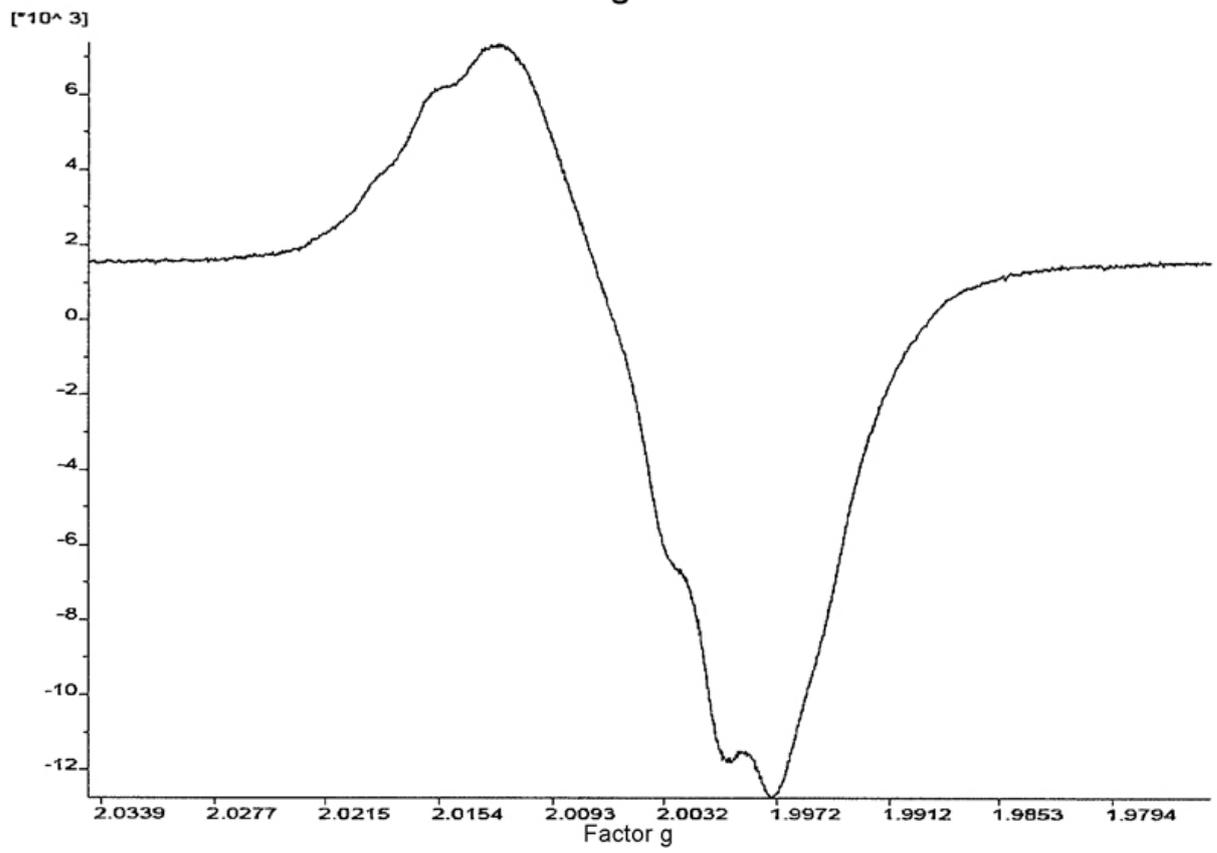


Figura 5D

