

10467



370167

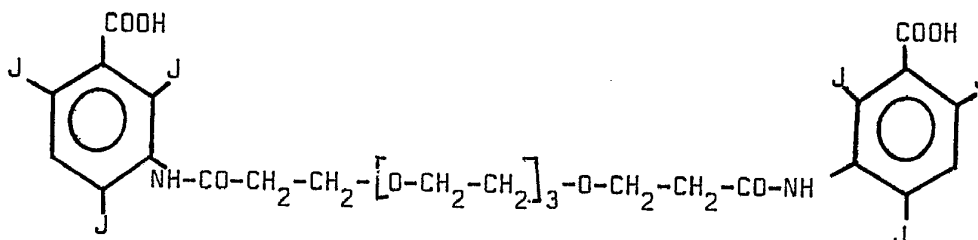
SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE A 61  
SUBCLASE B

MEMORIA DESCRIPTIVA  
de un Certificado de primera adición por:  
"MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA  
PATENTE PRINCIPAL Nº 366.459, sobre PRO-  
CEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA -  
4,7,10-TRIOXATRIDECAN-1,13-DIOIL-BIS (3-  
CARBOXI-2,4,6-TRIYODO-ANILIDA), APROPIA-  
DA PARA LA UTILIZACION EN CALIDAD DE AGEN  
TE DE CONTRASTE DE RAYOS X"; a nombre de  
BRACCO INDUSTRIA CHIMICA Società per -  
Azioni, de nacionalidad italiana, domici  
liada en 50, Via E. Folli, Milan (ITALIA).

-----ooo000ooo-----

El presente invento concierne a la preparacion de  
la nueva 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-car  
boxi-2,4,6-triyodo-anilida), apropiada para la utilización  
en calidad de agente de contraste de rayos X, de la fórmu  
la

5





así como de sus sales metálicas y amónicas solubles en agua y atóxicas.

Este compuesto debe utilizarse preferiblemente en calidad de agente de contraste para la bilis de aplicación parenteral.

Los agentes de contraste para la bilis que han de ser administrados oralmente - por lo que se sabe de ellos hasta ahora - tienen la desventaja de que solo varias horas después de su administración permiten imágenes de contraste de los órganos biliares. En este caso, además, la calidad de la imagen depende de diferentes circunstancias externas y, por lo tanto, frecuentemente es insegura.

Los agentes de contraste para la bilis susceptibles de ser administrados intravenosamente hasta ahora conocidos, por el contrario, son concentrados solo insuficientemente en la bilis. Una parte aproximadamente igual de la dosis administrada pasa a la orina.

El agente de colecistografía parenteral utilizado hasta ahora con la mayor frecuencia, conduce además siempre eventualmente de nuevo a complicaciones que terminan letalmente. (La Radiología Médica, volumen LII, Julio 1.966, páginas 626-657).

Por lo tanto, existe una necesidad de un agente de contraste de la bilis el cual, después de administración intravenosa, se concentre de modo especialmente específico en la bilis, muestre un paso a la orina solamente moderado, y sea bien compatible. En este caso, el paso del agente de con-



traste desde la corriente sanguínea a la bilis debe tener lugar con velocidad especialmente alta; es decir, el agente de contraste debe mostrar un alto máximo de transporte biliar.

5 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que la -  
4,7,10,13-tetraoxahexadecán-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-  
triyodo-anilida) [sustancia A] muestra en grado especialmente  
alto estas propiedades específicas necesarias para un agente  
de contraste para la bilis de administración parenteral.

10 Las siguientes tablas I, II y III en las que se ha  
señalado con trazo blanco la orina y con negro la bilis demuestran  
cuantitativamente las proporciones, a saber en comparación  
con las dos sustancias B y C, anteriormente conocidas,  
ya utilizadas practicamente en agentes de colecistografía parenterales.  
15 Los datos fueron determinados siempre de acuerdo  
con métodos idénticos y bajo condiciones externas idénticas.

A: 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,  
4,6-triyodo-anilida).

[BIC 10.610]

20 B: Adipinoil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida).

[Adipiodona]

Memoria de Patente USA número 2.776.241

C: Diglicoloil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo anilida)

[Acidum ioglycamicum]

25 Memoria de Patente USA número 2.776.241-

TABLA I



Compuesto	Toxicidad DL 50 mg/kg de ratón intravenosamente. Tiempo de inyección		Segregación del agente de contraste % de la administración intravenosa de 100 mg/kg en el conejo después de 3 horas		Proporción de segregación Bilis/ Orina
	30"	120"	Bilis	Orina	
A	5100	5200	77	18	4,3
B	2400	3400	37	38	0,98
C	4200	4200	30	41	0,73

Valoración de la colecistografía

3 pares de perros con peso corporal de 7 a 10 kg fueron sometidos a ensayos colecistográficos comparativos, utilizando los agentes de contraste de rayos X A, B y C, que fueron administrados intravenosamente en forma de sus sales de N-metil glucamina cada vez en dosis correspondientes a 66,9 mg de yodo/kg de peso corporal. Cada par de animales fué sometido sucesivamente, a intervalos de 5 días, a estas investigaciones colecistográficas con cada uno de los tres compuestos, a saber de acuerdo con el esquema de cuadrado latino en la sucesión:

Primer par: A, B, C

Segundo par: B, C, A

Tercer par: C, A, B

Los resultados de la investigación están reproducidos en la Tabla II en la página 5 (en la memoria alemana), siendo expresada la calidad de las imágenes de contraste logradas por el índice colecistográfico de acuerdo con Hoppe [vease J.O.



Hoppe, J. American Pharmaceutical Association Sci. Ed. 48, páginas 368-379(1.959)]. El compuesto A muestra el máximo índice colecistográfico.

Los datos de las tablas I y II demuestran claramente el importante progreso del compuesto A con relación a los compuestos B y C antes conocidos, de constitución similar, en lo que se refiere a compatibilidad o tolerancia, paso a la bilis y densidad de sombras.

TABLA II

Colecistografía					
Indice colecistográfico de acuerdo con Hoppe: Valores de 0 a 4.					
0 = negativo, 1 = débil, 2= suficiente, 3=bueno, 4= muy bueno.					
Compuesto	Tiempo Minutos	Primer par Valor medio	Segundo par Valor medio	Tercer par Valor medio	Promedio de todos los valo res:
A) BIC 10: 610	15	0,75	1,75	1,5	1,33
	30	1,5	2,25	1,75	1,83
	45	2,0	2,75	2,25	2,33
	60	2,25	3,0	2,5	2,58
	90	2,25	3,25	2,5	2,66
	120	2,5	3,25	2,75	2,83
	240	2,5	3,0	2,75	2,75
	360	2,5	3,25	2,75	2,83
	480	2,5	3,0	2,5	2,66
B) Adipio- done	15	0,25	0,75	0,25	0,41
	30	0,75	1,5	0,5	0,91
	45	1,0	1,5	1,0	1,16
	60	1,5	1,5	1,25	1,41
	90	1,75	2,0	1,25	1,66
	120	2,0	2,0	1,5	1,83
	240	2,5	2,25	2,25	2,33
	360	2,75	2,25	2,25	2,41
	480	2,5	1,75	1,75	2,00
C) Acidum iogly- camicum	15	0,5	0,5	0	0,33
	30	0,75	1,0	0,75	0,83
	45	1,0	1,0	1,25	1,08
	60	1,5	1,25	1,25	1,33
	90	1,5	1,25	2,0	1,58
	120	1,5	1,5	2,0	1,66
	240	1,5	1,75	2,25	1,83
	360	1,75	1,75	2,5	2,00
	480	1,25	2,0	2,5	1,91



También en lo que se refiere a la cinética de la segregación en la bilis, el compuesto A (BIC 10.610) obtenido de acuerdo con el invento es claramente superior a los agentes de contraste para la bilis intravenosos B (Adipiodona) y C (Acidum Ioglycamicum) hasta ahora utilizados.

G. Miller y otros, Schweiz. med. Wochenschrift 99, 577-581 (1.968) han mostrado que los máximos de transporte biliares son de importancia decisiva para la valoración y dosificación conveniente de los agentes de contraste para la bilis administrados intravenosamente.

Cuanto mayor es la capacidad individual de un agente de colecistografía intravenoso, de ser retirado con rapidez desde la corriente sanguínea por los órganos biliares y de ser segregado a través de éstos, y por lo tanto cuanto más alto se encuentra el máximo de transporte biliar, se obtienen densidades de sombra tanto mayores, y con ello tanto mejores imágenes de contraste de rayos X de los órganos biliares pueden obtenerse.

Una elevación de la dosis, por encima de la capacidad de transporte de los órganos biliares para el agente de contraste en cuestión, no tiene como consecuencia ninguna mejora de las imágenes de contraste. El exceso de agente de contraste es segregado a través de los riñones, lo cual se hace observable claramente en la segregación en los riñones acrecentada al elevar la velocidad de aplicación (figuras 1, 2 y 3). Cualquier exceso carga al organismo de manera totalmente innecesaria y disminuye el campo libre de seguridad de la investigación de rayos X.



En la Tabla III y en las figuras 1, 2 y 3 están reproducidos los datos referentes a la determinación de los máximos de transporte biliar de los compuestos A, B y C.

METODICA:

5 De perros anestesiados, por aplicación de cateter a los conductos biliares y a los uréteres, se tomaron continuamente y analizaron las secreciones de bilis y de orina.

Después que se hubo estabilizado la secreción de bilis y de orina, se infundió en la vena yugular izquierda la solución de agente de contraste de rayos X que había de ser ensayada.

La velocidad de infusión fué elevada sucesivamente:

- 1) 0,81  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  en los primeros 180 minutos ( $\mu\text{M}$ =micromoles)
- 2) 1,62  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , en los minutos 180 a 300
- 3) 3,24  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , en los minutos 300 a 420.

La bilis y la orina fueron recogidas cada 30 minutos. El contenido de yodo de las muestras fué determinado mediante un autoanalizador. A partir de los contenidos de yodo se calcularon las cantidades de agente de contraste de rayos X, expresadas en micromoles, que se segregaron por kg de animal y por minuto.

TABLA III

Tiempo	Infusión intravenosa $\mu\text{M kg}^{-1} \text{min}^{-1}$	Determinación de los máximos de transporte biliares. $\text{min}^{-1}$ Promedio de 4 experimentos con perros; secreción $\mu\text{M kg}^{-1} \text{min}^{-1}$					
		A: BIC 10.610		B: Adipiodona		C: Acidum Ioglycamicum	
		Bilis	Orina	Bilis	Orina	Bilis	Orina
30'	0,81	0,070	0,020	0,029	0,006	0,003	0,005
60'	0,81	0,401	0,029	0,176	0,034	0,133	0,054
90'	0,81	0,488	0,066	0,286	0,070	0,291	0,108
120'	0,81	0,527	0,080	0,319	0,086	0,361	0,145
150'	0,81	0,542	0,092	0,348	0,103	0,412	0,164
180'	0,81	0,533	0,114	0,342	0,110	0,425	0,162
210'	1,62	0,637	0,228	0,385	0,190	0,469	0,308
240'	1,62	0,749	0,357	0,460	0,287	0,552	0,387
270'	1,62	0,786	0,448	0,472	0,370	0,580	0,467
300'	1,62	0,794	0,533	0,475	0,431	0,624	0,498
330'	3,24	0,785	0,841	0,477	0,565	0,651	0,698
360'	3,24	0,914	1,225	0,461	0,637	0,640	0,921
390'	3,24	0,828	1,526	0,464	0,685	0,720	0,999
420'	3,24	0,907	1,644	0,454	0,680	0,732	1,157





COMENTARIOS:

5 A partir de la Tabla III y de las representaciones gráficas (figuras 1 a 3) se desprende que el compuesto A obtenido de acuerdo con el invento muestra un máximo de transporte biliar (capacidad de transporte) esencialmente mayor que los compuestos B y C antes conocidos.

Los máximos de transporte son aproximadamente los siguientes:

- 10 A: 0,83 - 0,91  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{min}^{-1}$   
B: 0,45 - 0,47  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{min}^{-1}$   
C: 0,65 - 0,73  $\mu\text{M kg}^{-1} \text{min}^{-1}$

15 La capacidad de transporte del compuesto A es casi el doble de la del agente de contraste para la bilis intravenoso B antes conocido, utilizado hasta ahora con la mayor frecuencia.

Evidentemente, mediante la más rápida segregación en la bilis del compuesto A, los órganos biliares son expandidos también algo más intensamente, lo cual eleva nuevamente la densidad de sombras.

20 La 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida) es utilizada predominantemente en forma de sus soluciones de sales metálicas y/o amínicas atóxicas, acuosas concentradas.

25 En calidad de sales metálicas se consideran preferiblemente: Las sales de sodio y/o de litio; en calidad de sales amínicas, preferiblemente sales de alcanolamina, tales como - por ejemplo la sal de N-metil-glucamina, la de dietanolamina o



la sal de morfolina y muchas otras más. Se pueden utilizar - también mezclas de estas sales. En algunos casos, también se puede reemplazar una parte de los iones alcalinos por iones calcio o magnesio.

5                   La preparación del nuevo agente de contraste de rayos X está caracterizada porque se hace reaccionar ácido 3-amino-2,4,6-triyodo-benzoico con un derivado reactivo del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico, y después de esto se transforma la 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida) obtenida en  
10 una forma farmacéuticamente aceptable, apropiada para la utilización en calidad de agente de contraste de rayos X parenteral, por formación de sales y por mezclado con uno o varios ingredientes.

15                   En calidad de derivado reactivo del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico se utiliza, en la reacción de acuerdo con el invento preferiblemente un halogenuro de ácido del mismo, especialmente su cloruro de ácido de la fórmula  $(Cl-CO-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_3-O-CH_2-CH_2-CO-Cl)$  o  
20 un anhídrido mixto del mismo.

                  En calidad de anhídridos mixtos del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico, se consideran: sus anhídridos con ácidos fosfóricos (por ejemplo, un difosfito de 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioilo), con ácido nítrico, con  
25 ácidos carboxílicos o con semiésteres de ácidos carbónicos.

EJEMPLO:

4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida)



10,3 g (0,02 moles) de ácido 3-amino-2,4,6-triyodo-  
benzoico, suspendidos en 20 ml de dimetilacetamida, son mez -  
clados a 95°C con 3,65 g de dicloruro de ácido 4,7,10,13-tetra  
oxahexadecan-1,16-dicarboxílico, y a continuación son agita-  
5 dos durante 3 horas más a 95-100°C.

La mezcla de reacción es introducida con agitación  
en aproximadamente 200 ml de agua. El producto separado, des  
pués de separar por decantación el agua, es disuelto en 4 ml  
de hidróxido de sodio al 30% y 200 ml de agua, es decolorado  
10 con carbón activo, y es añadido gota a gota a 100 ml de agua,  
que contienen 5 ml de ácido clorhídrico al 36%.

El precipitado resultante = 11,1 g; p- de f: 125-  
130°C- es disuelto en 18 ml de agua, que contienen 2 ml de -  
hidróxido de amonio al 30%, es mezclado con 20 ml de solución  
15 saturada de cloruro de amonio y es mantenida durante 2 días  
a 5°C, separándose la sal de amonio de la 4,7,10,13-tetraoxahe  
xadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo anilida).

Esta es separada por filtración, es disuelta en agua  
y es mezclada con ácido clorhídrico, separándose el ácido libre.  
20 Este muestra los siguientes datos característicos:

Punto de fusión: 125°C (sinterización a 110°C)

Análisis: Calculado para  $C_{26}H_{26}I_6N_2O_{10}$ . Peso molecular:  
1287,92 (después de secar en vacío a 120°C).

C: calc.: 24,24%; enc: 24,26%

25 I: calc: 59,12%; enc: 59,07%

Cromatograma en capa delgada: sobre gel de sílice con butanol/  
ácido acético glacial/agua = 3:2:  
1 en calidad de agente eluyente:  
 $R_f = 0,53$



Solubilidades: Este compuesto es prácticamente insoluble en agua, en acetato de etilo y cloroformo, y por el contrario fácilmente soluble en alcoholes inferiores:

5

S a l e s : Solubilidades en agua a 20°C:

Sal de sodio: aproximadamente 100% (g/V)

Sal de N-metilglucamina: aproximadamente 100%(g/V)

10

El dicloruro de ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico necesario como producto intermedio es preparado de la siguiente manera:

15

a) 148,5 g de 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-di-nitrilo- (memoria de patente USA núm. 2.401,607) son añadidos, a 15°C, a una solución de 232 g(2,45 moles) de ácido sulfúrico concentrado en 290 ml de etanol absoluto. Se pone a ebullición durante 15 horas bajo agitación en el refrigerante de reflujo, se enfría, se vierte la solución de reacción en 1000 g de hielo y 250 g de sulfato de amonio, se extrae con cloruro de metileno el éster dietílico del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico formado, se seca el extracto, se separa por evaporación el disolvente, y se destila el producto:

20

Rendimiento: 97 g de éster dietílico del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico.

Punto de ebullición: 190-195°C/0,005 mm de Hg.

25

b) 97 g de éster dietílico del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico disueltos en 200 ml de agua, son añadidos a una solución de 24,4 g de NaOH en 50 ml de agua. La mezcla de reacción es calentada sobre baño de vapor durante 90 minutos.



Después de enfriar, la mezcla de reacción es extraída con éter. La fase acuosa es evaporada hasta sequedad. El residuo es lavado con acetona.

5 La sal disódica del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico obtenida (107 g, p. de f. 102-104°C, contenido 87,8%, rendimiento:100%) es recogida en aproximadamente 300 ml de agua y es transformada en el ácido dicarboxílico libre con la cantidad calculada de ácido clorhídrico concentrado. La solución de reacción es evaporada hasta sequedad.

10 El residuo es recogido en acetona, el cloruro de sodio separado es filtrado, y el filtrado acetónico es concentrado totalmente por evaporación.

15 El residuo de concentración por evaporación es extraído con éter dietílico. A partir del extracto etéreo seco se obtienen, después de la concentración por evaporación, en calidad de residuo, 56 g de ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico líquido.

Rendimiento: 68% de la teoría.

Peso equivalente: 149,5 (calculado 147,2).

20 c) El dicloruro de ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico se obtiene a partir del ácido libre b) (56g), por adición cuidadosa de aproximadamente 100 ml de cloruro de tionilo y subsiguiente calentamiento a 40-50°C.

25 El cloruro de tionilo en exceso es separado por evaporación en vacío después de filtrar la solución de reacción hasta dejarla transparente. El residuo de la separación por evaporación consiste en el deseado dicloruro de ácido dicarboxílico.



EJEMPLOS DE FORMULACION:

El nuevo compuesto más arriba descrito es transformado, de acuerdo con su utilización preferida en calidad de agente de contraste para la bilis parenteral, generalmente en soluciones de sales inyectables o infundibles.

Para esto son especialmente apropiadas soluciones acuosas de sales de alcanolamina de los ácidos citados en el precedente ejemplo de preparación, eventualmente con un contenido de la correspondiente sal de sodio o de litio o eventualmente de sal de calcio o magnesio, conteniendo estas soluciones usualmente aproximadamente 140 a 400 mg de yodo/ml.

EJEMPLO 1:

- a. 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida) (1287.92) 508 g
- b. N-metilglucamina 117,1 g
- c. Hidróxido de sodio 7,6 g
- d. Sal disódica del ácido etilendiamino-N,N'-tetra-acético 0,1 g
- e. Agua, bidestilada hasta 1000 ml.

La solución de sal es preparada de acuerdo con la receta anterior, es ajustada a pH  $7,1 \pm 0,2$ , es filtrada cuidadosamente, es cargada en ampollas de 10 y 20 ml y es esterilizada.

Contenido de yodo: 300 mg/ml.

EJEMPLO 2:

- a. 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-



- (3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida) (1287,92) 254 g
- b. N-metilglucamina 39 g
- c. Hidróxido de sodio 7,78 g
- d. Sal disódica del ácido etilendiamino-N,N'-  
5 tetra-acético 0,1 g
- e. Agua (bidestilada) hasta 1000 ml.

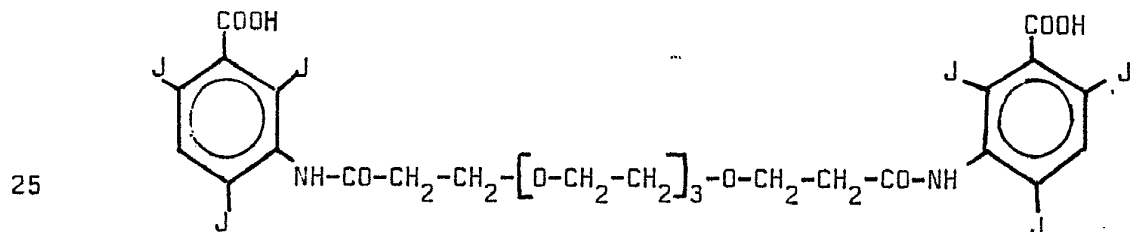
La solución de sal es preparada de acuerdo con la receta anterior, es ajustada a pH 7,1 ± 0,2, es filtrada cuidadosamente, es cargada en frascos de 100 ml y es esterilizada.

10 Contenido de yodo: 150 mg/ml.

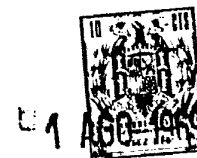
N O T A  
=====

Se reivindica como nuevo y de propia invención.

15 1.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 366.459 sobre procedimiento para la preparación de la 4,7,10-trioxatridecan-1,13-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida) apropiada para la utilización en calidad de agente de contraste de rayos X, caracterizado porque estableciéndose el compuesto 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dioil-bis-(3-carboxi-2,4,6-triyodo-anilida), apropiada para la utilización en calidad de agente de contraste de rayos X, de la  
20 fórmula



así como de sus sales metálicas y amónicas solubles en agua, atóxicas, se ha previsto que se haga reaccionar ácido 3-amino-



2,4,6-triyodo-benzóico con un derivado reactivo del ácido 4, 7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico, se aísle el producto y se transforme en una de sus sales metálicas o amínicas atóxicas.

5                    2.- Mejoras según la reivindicación anterior, caracterizadas porque en calidad de derivado reactivo del ácido 4,7,10,13-tetraoxahexadecan-1,16-dicarboxílico, se utilizan preferiblemente sus halógenuros de ácido, especialmente su cloruro de ácido, o un anhídrido mixto del mismo.

10                   3.- Mejoras según las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque la reacción se lleva a cabo dentro de un margen de temperaturas desde por encima de 20°C hasta por debajo de 250°C.

15                   4.- "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 366.459 SOBRE PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA 4,7,10-TRIOXATRIDECAN-1,13-DIOIL-BIS-(3-CARBOXI-2,4,6-TRIYODO-ANILIDA), APROPIADA PARA LA UTILIZACION EN CALIDAD DE AGENTE DE CONTRASTE DE RAYOS X".

20                   Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de diez y seis hojas escritas a máquina por una sola cara y de sus correspondientes dibujos.

Madrid, 1º de Agosto de 1.969  
CARLOS FERNÁNDEZ GANDELA  
F.P.

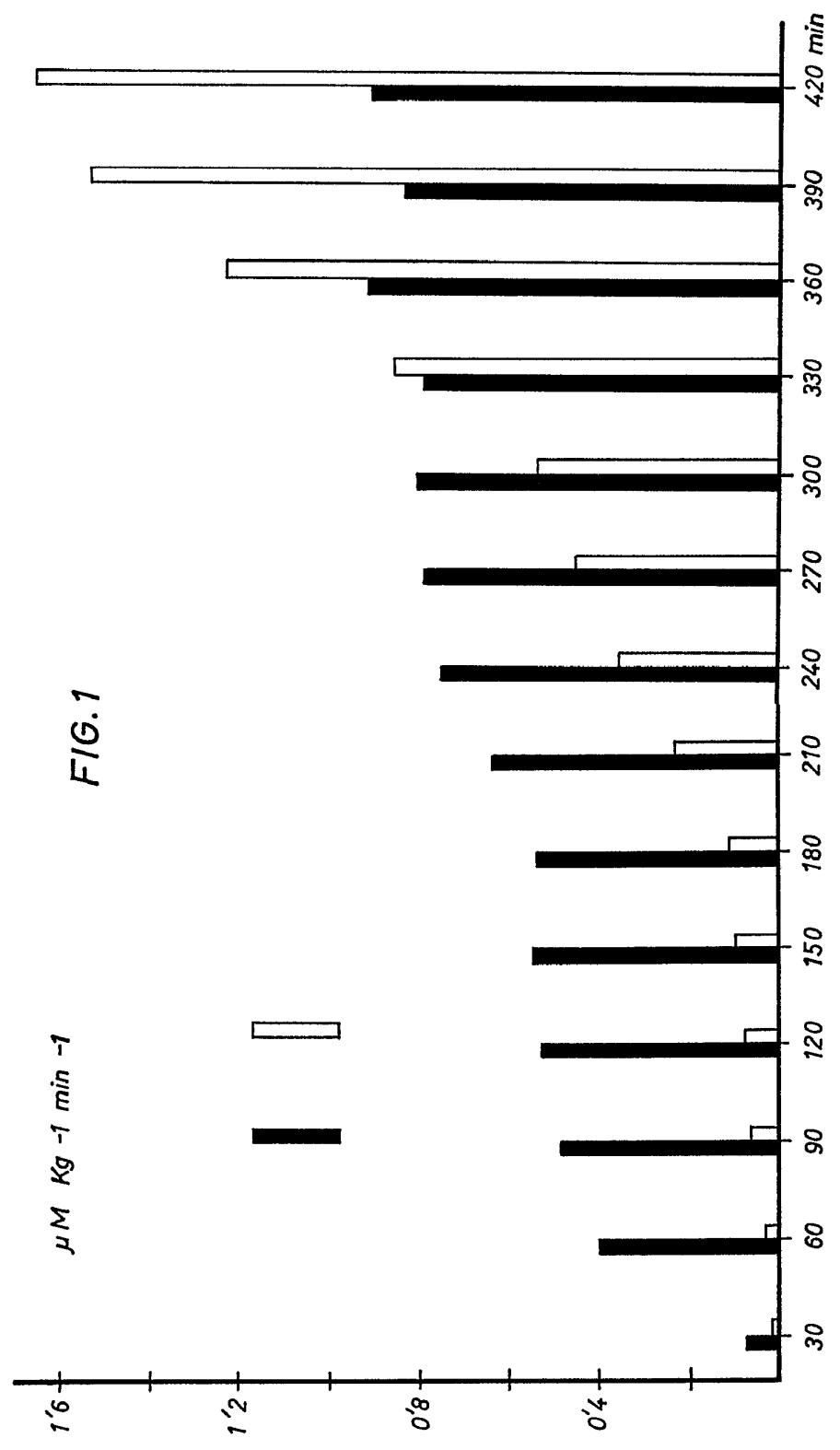
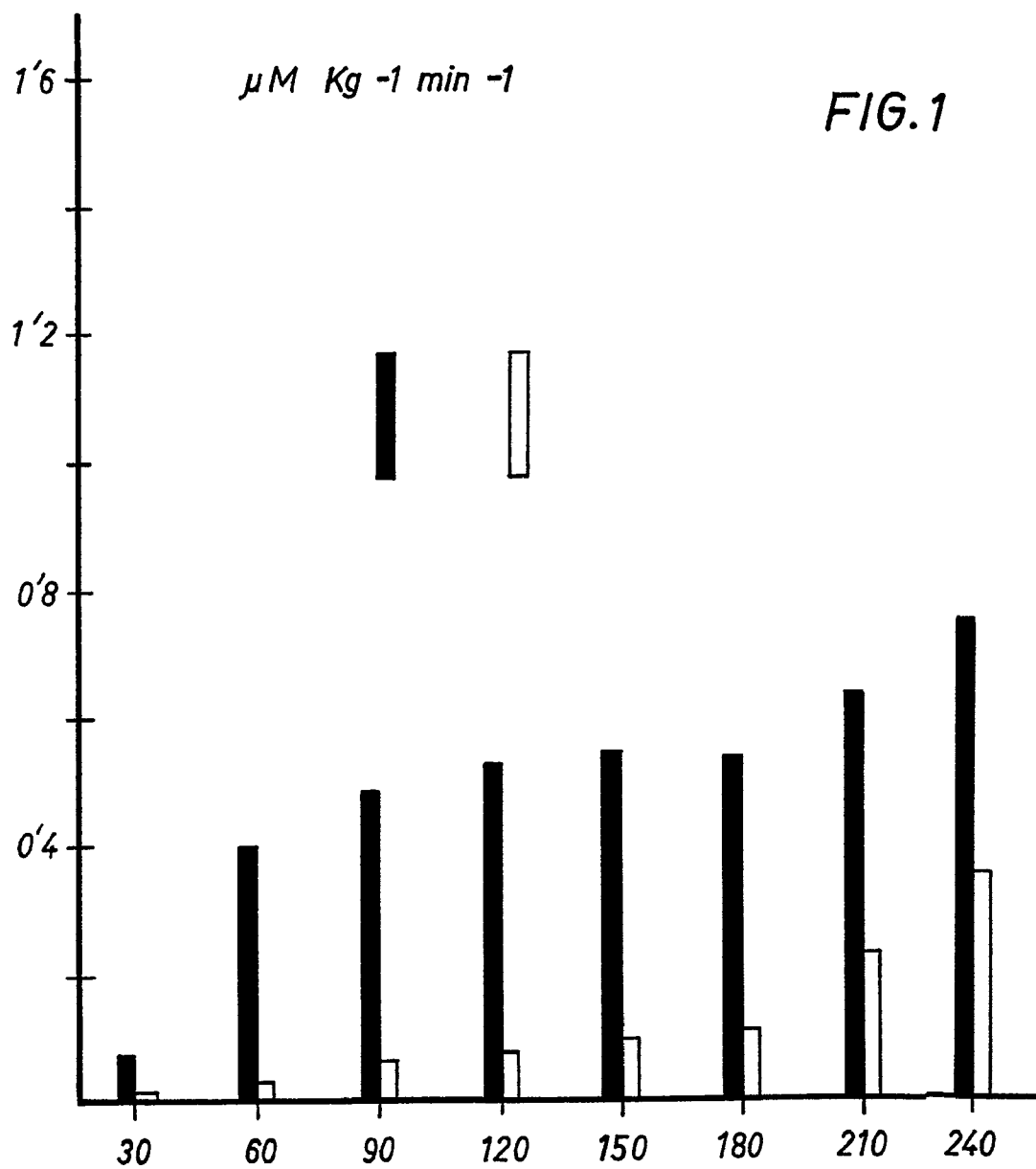


Fig. 1

1962

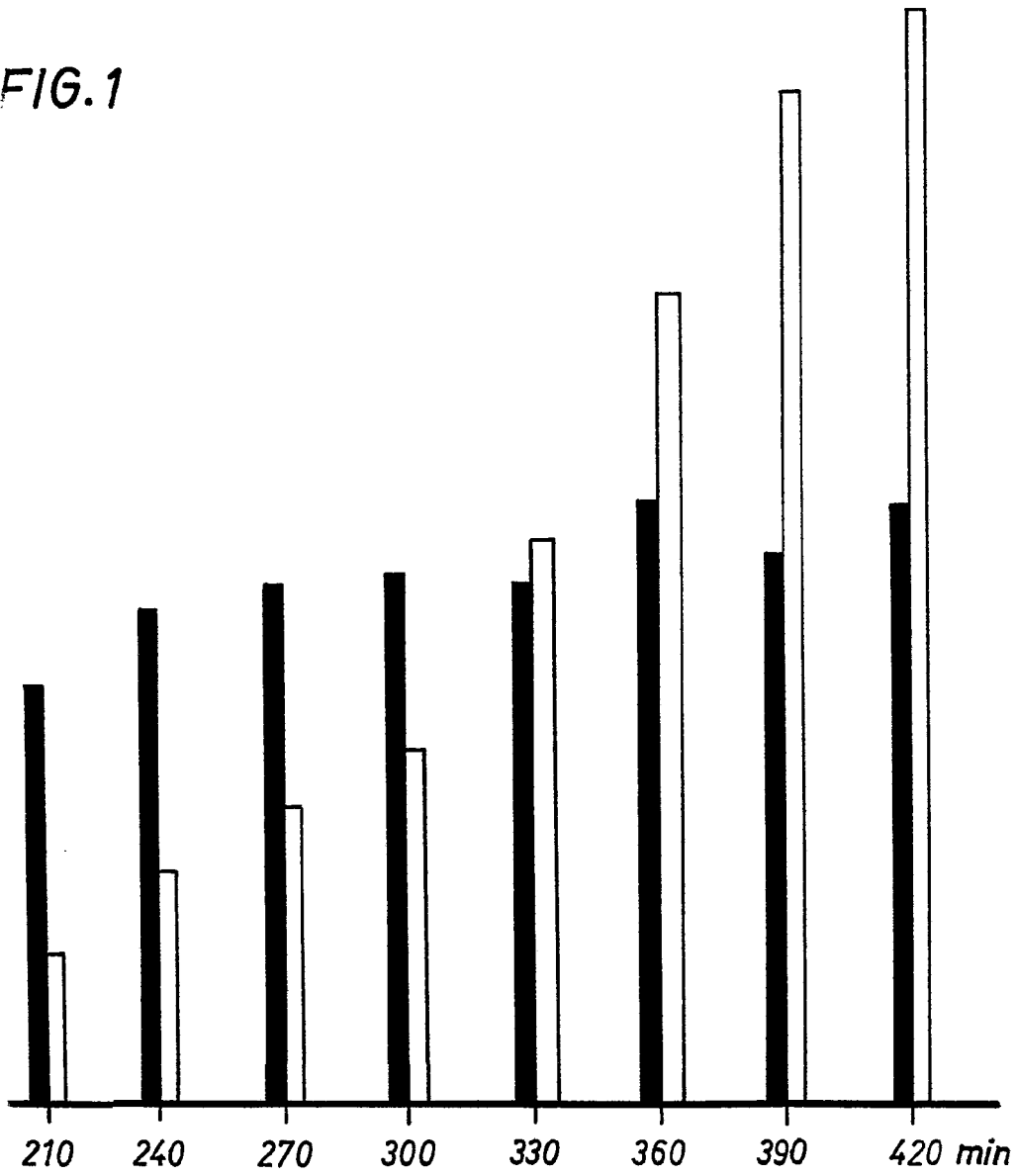
*[Handwritten signature]*



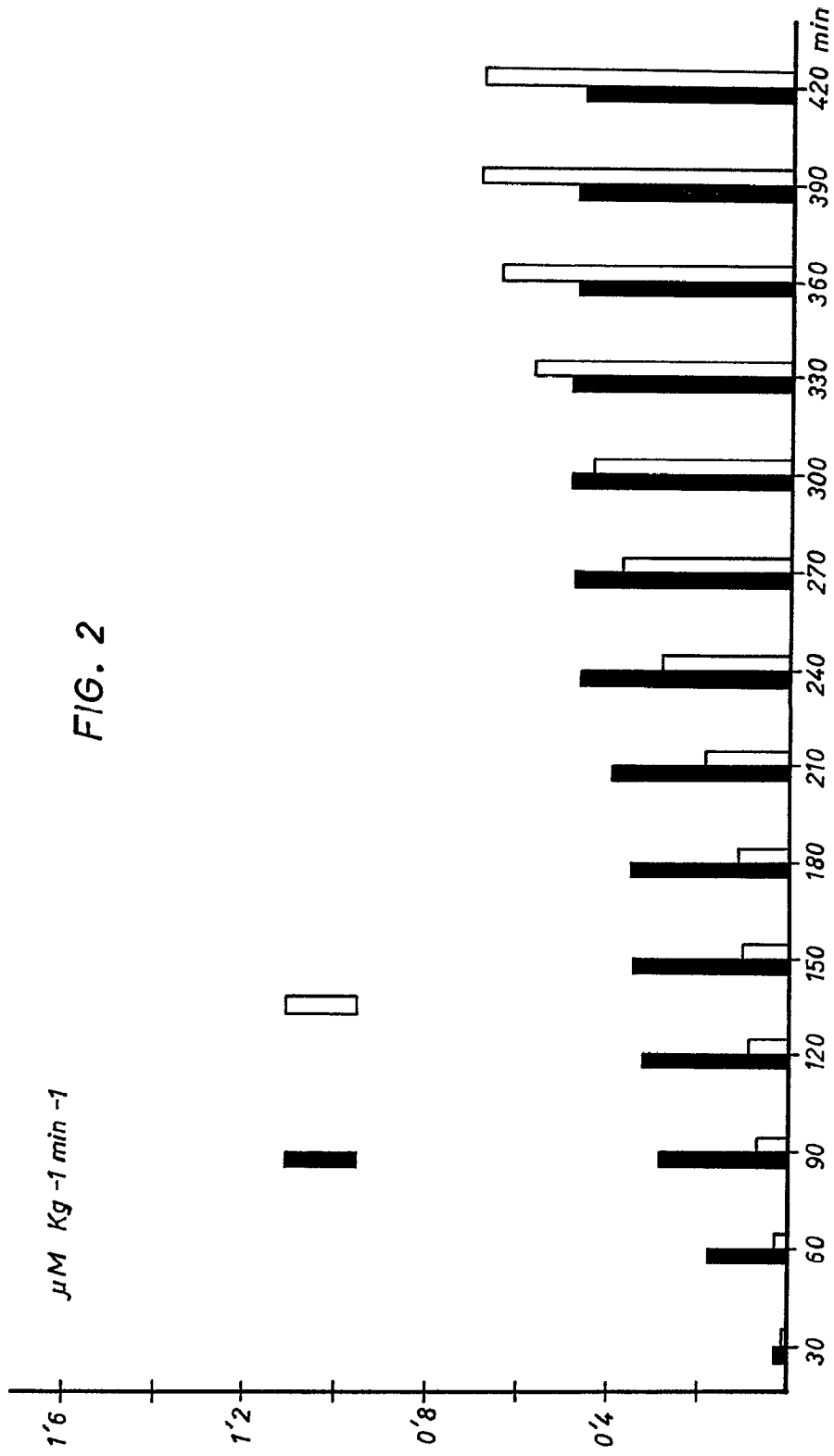
Variable



FIG.1

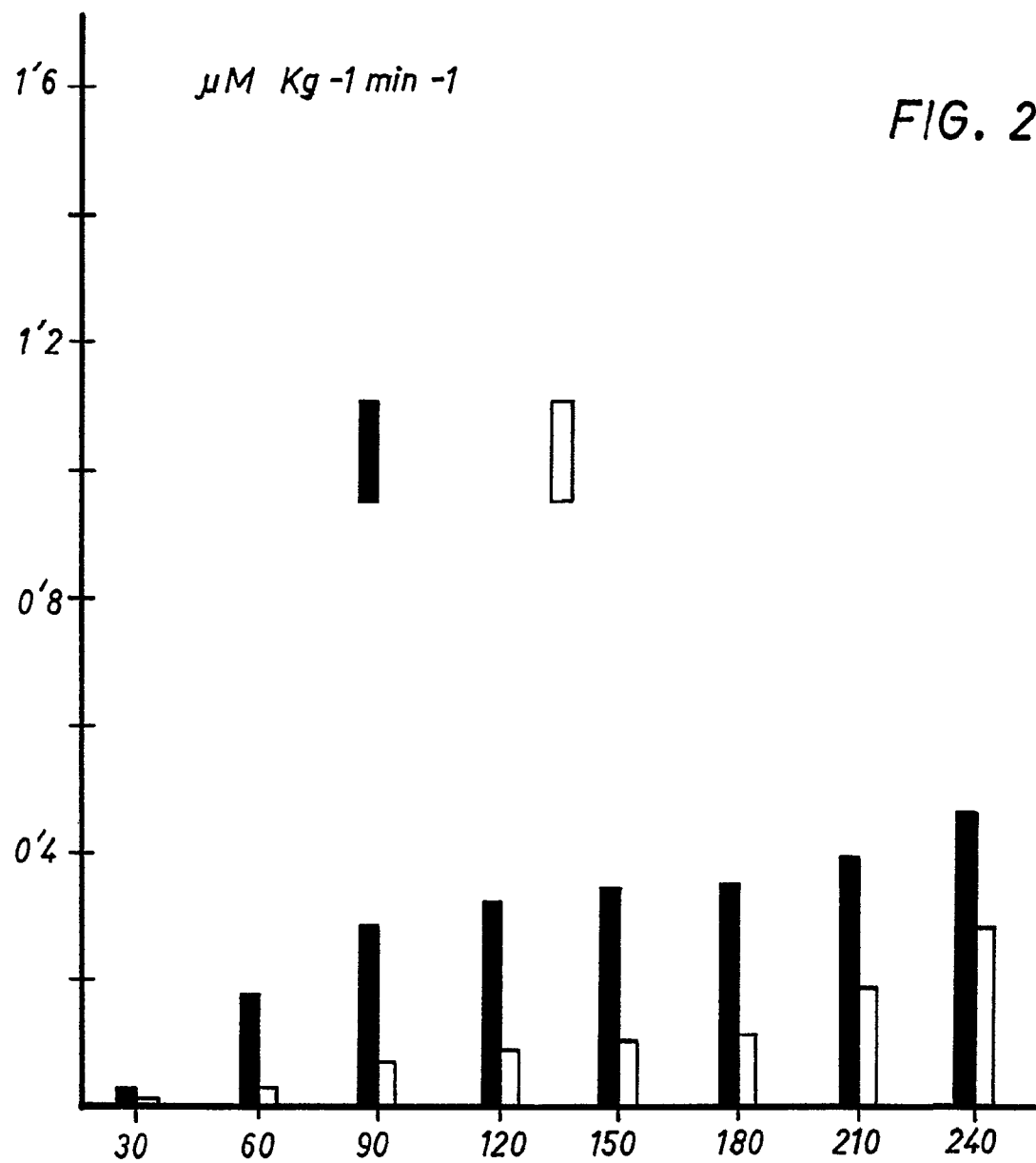


Madrid, 1 Agosto 1969



1981

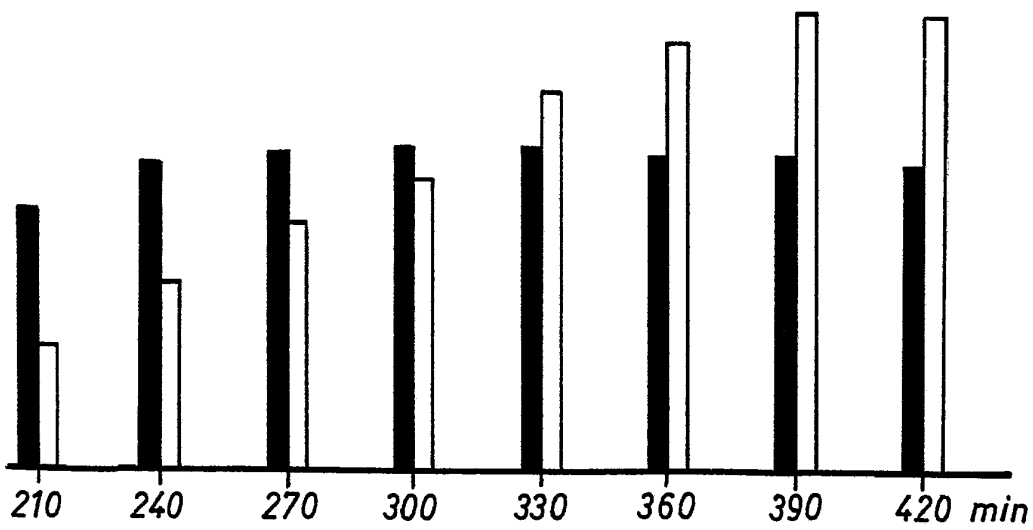
1981



Variable variable



FIG. 2

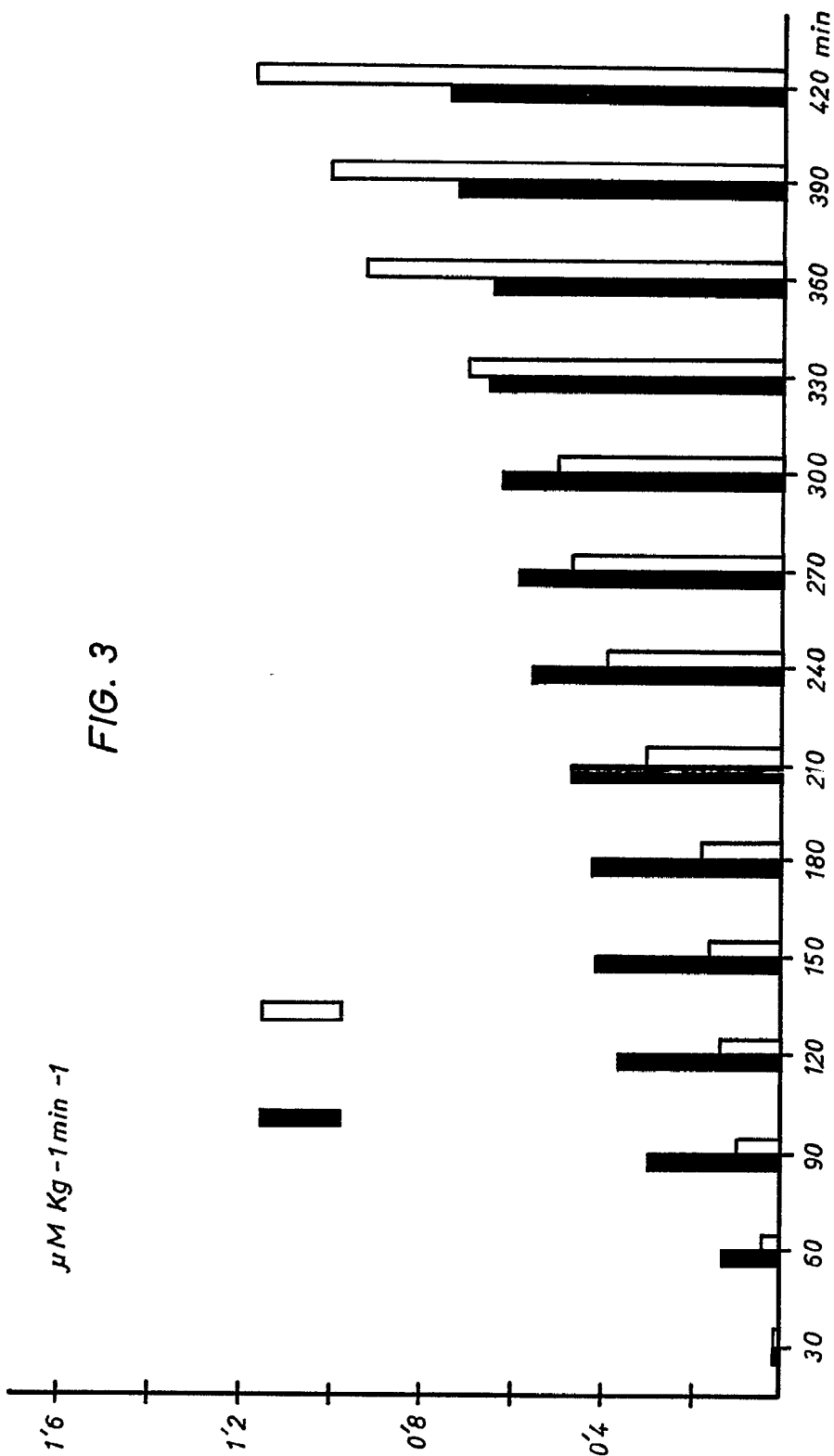


Handwritten signature or initials in the bottom right corner.

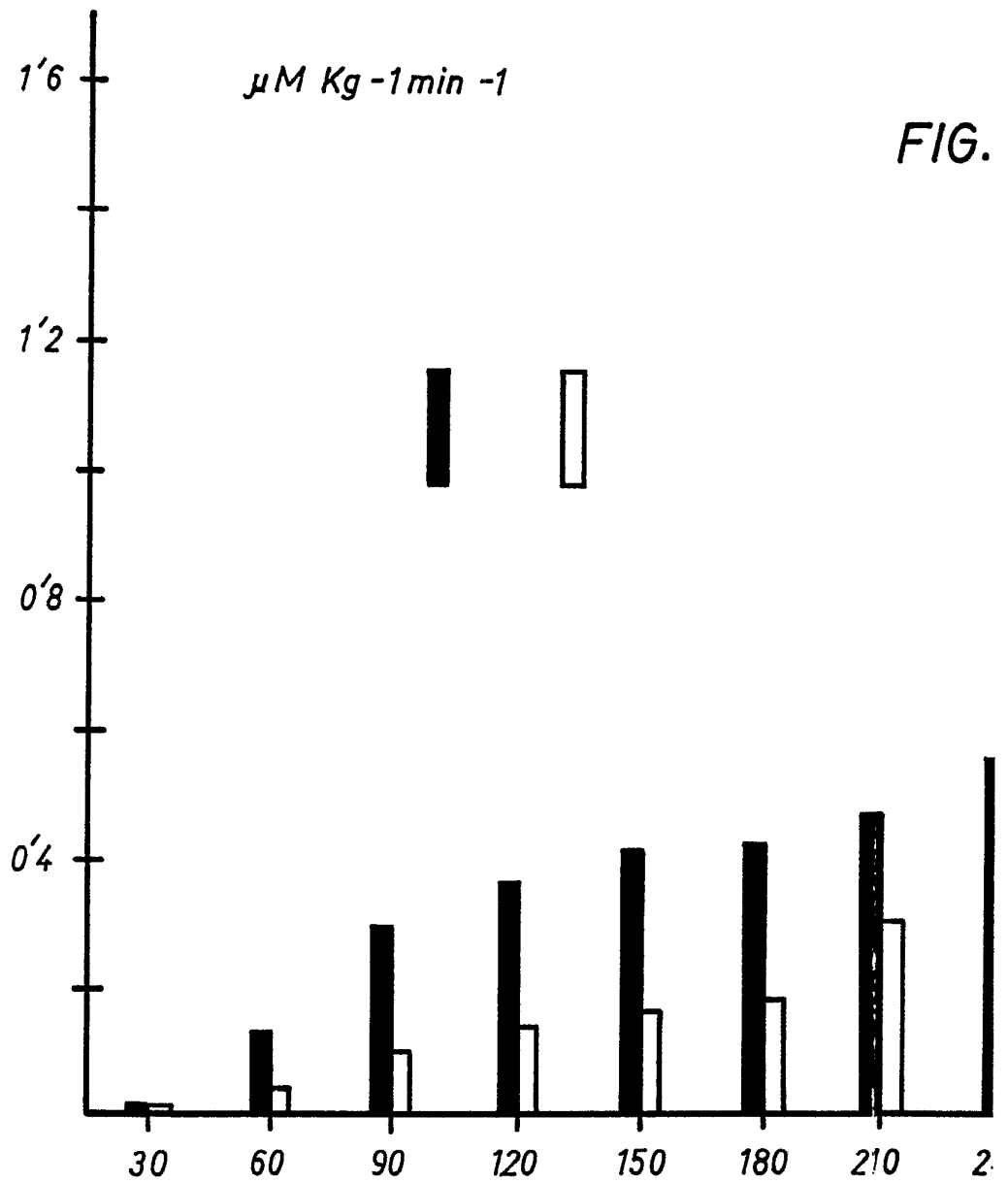


2000

1



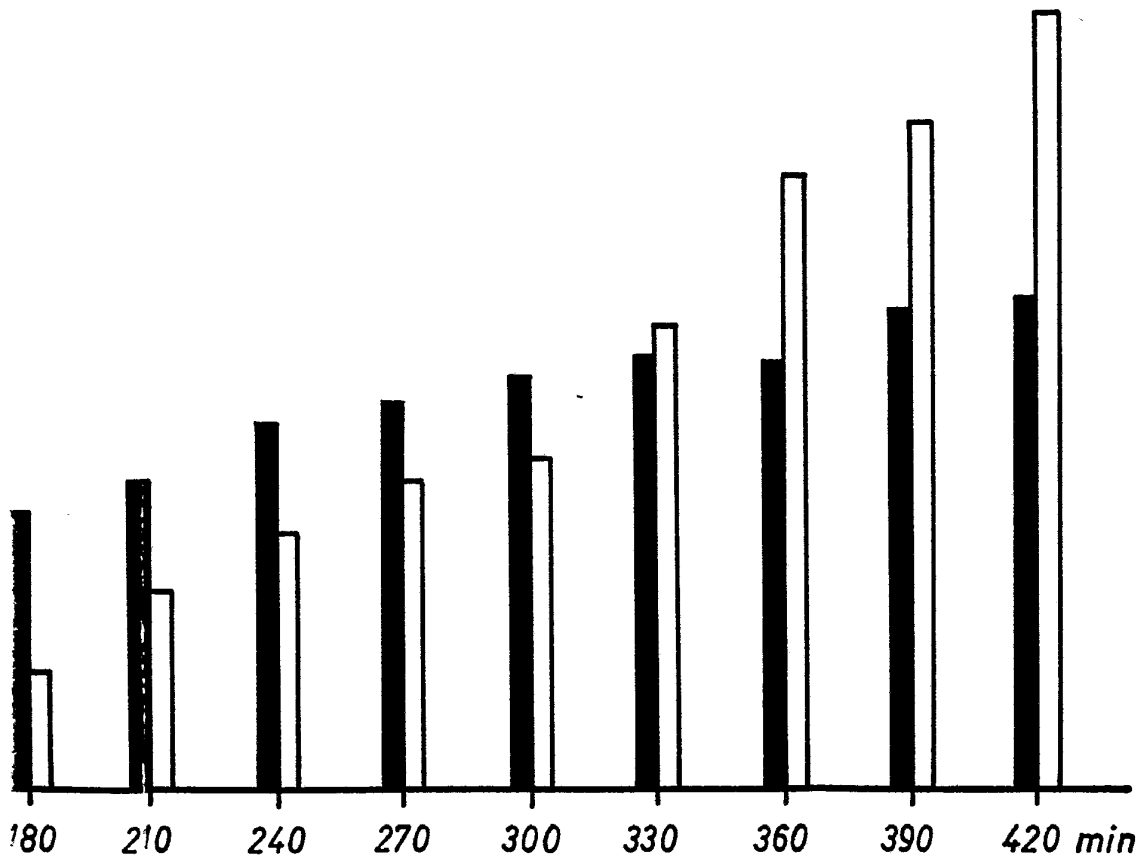
*[Handwritten signature]*



Da 2. variabile



FIG. 3



*[Handwritten signature or scribble]*