

P.-34.593

Serial No. 10861/66



337747

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 8 de Marzo de 1967, con el número 337.747

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC., entidad norteamericana establecida en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN DISPOSITIVO PARA ENSAYO PARA DETECTAR UNA SUSTANCIA
EN UN FLUIDO ACUOSO"

=====

En los años recientes se han desarrollado numerosos métodos de ensayo sencillos para detectar rápida y exactamente ciertos constituyentes de flúidos acuosos biológicos, industriales y otros. En estos métodos se emplea
5 corrientemente una composición unitaria de reactivo de ensayo que, por contacto con un constituyente determinado del flúido que se está sometiendo a ensayo, produce una respuesta cromogénica. Estos métodos que se llaman métodos



colorimétricos de análisis, ya que dependen de la aparición o desaparición de un color, pueden ser cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos, según la sensibilidad del método, el nivel de concentración de la sustancia que se esté detectando, etc. Usualmente, la cantidad de color formada es proporcional a la cantidad de concentración de la sustancia que se está detectando, lo que permite hacer una determinación cuantitativa basada en la medida del color formado, o una comparación del color formado con una tabla normalizada de colores.

También se han desarrollado otros métodos y composiciones de ensayo simplificados, en los que se emplean respuestas químicas, distintas de las cromogénicas, para indicar la presencia de la sustancia que se está detectando. Estos métodos dependen de fenómenos químicos tales como precipitación y reacciones catalizadas por enzimas, formación de gas, coagulación, aglutinación, formación de moléculas que absorben luz ultravioleta e infraroja, y fluorescencia, para mencionar sólo unos pocos.

Tal como se usa en lo sucesivo, el término "detectar" o "detección" significa el análisis, tanto cuantitativo como cualitativo, de una sustancia en un fluido acuoso.

Se han desarrollado incluso métodos más sencillos para detectar sustancia en fluidos acuosos, en los que se utiliza un miembro vehículo para la composición de ensayo simplificada antes descrita. En tal método, la composición de ensayo, incorporada en el miembro vehículo, se pone en contacto con el fluido que se esté ensayando y es separada del mismo, conservando una pequeña cantidad de fluido acuoso sobre o en el mismo miembro vehículo.



Luego se compara la reacción causada por cualquier sustancia del fluido, que puede reaccionar específicamente con la composición de ensayo, con un patrón que puede estar directamente calibrado, respecto a la concentración de la sustancia que esté siendo detectada. Usualmente, el miembro vehículo es un material absorbente tal como el papel de filtro, madera, tela, etc. en el que se impregna la composición de ensayo, pero puede comprender también una tira de plástico a la que se adhiere la composición de ensayo, o un material absorbente impregnado con ella. En tal dispositivo de ensayo, si la reacción es cromogénica, la respuesta es un fenómeno superficial cuando la composición de ensayo está adherida a un vehículo plástico, pero en los dispositivos en que se utiliza un miembro absorbente, el color, o la falta de color, se presenta en todo el miembro.

En los sistemas de ensayo antes indicados, la composición o dispositivo para ensayo se conserva usualmente en estado seco, y se mantiene preparado para su uso instantáneo. En tal estado, la composición de ensayo, en forma de tabletas, polvos, gránulos o píldoras, y el dispositivo que comprende la composición de ensayo y un miembro vehículo, se conservan usualmente, por razones de estabilidad, en un recipiente cerrado, tal como una botella, paquete de chapa o envoltorio de plástico.

De las numerosas composiciones de ensayo simplificadas, que son específicas para detectar ciertos constituyentes de fluidos acuosos, muchas requieren un estado de Ph ácido, y algunas de ellas un estado de pH muy ácido. Otros métodos requieren que el estado de pH ácido sea



conservado de forma sustancialmente isohídrica, dentro de un cierto intervalo limitado de pH ácido. Se apreciará que, en tiempos pasados, las composiciones de ensayo utilizadas en estos sistemas han presentado problemas importantes, ya que el estado de pH ácido provocaba la descomposición de los reactivos, o bien, si se superaba esta obstáculo y se usaba la composición con un miembro vehículo, el pH muy ácido hacía que se degradase el miembro vehículo. La descoloración y desactivación del sistema de ensayo limitaban la forma importante de la aplicabilidad universal de estos sistemas, y la degradación del vehículo creaba un visible grado de desconfianza que no podía ser tolerado.

Los siguientes son ejemplos de los muchos ensayos que requieren un ambiente de pH ácido: urobilinógeno y compuestos de indol en flúidos biológicos, usando el reactivo de Ehrlich; proteínas en la orina y flúidos espinales, usando el método de error proteico de los indicadores; proteína en flúidos biológicos, usando métodos de precipitación; ácido fenilpirúvico usando el método del cloruro férrico y hierro, usando la reacción del ferrocianuro.

Un objeto de la presente invención es proporcionar, en una formulación de ensayo en seco, medios in situ para crear un ambiente de pH ácido, por contacto con un flúido acuoso.

Otro objeto es proporcionar una formulación y dispositivo de ensayo que son sustancialmente neutros hasta que se ponen en contacto con un flúido acuoso a ensayar.

337747



Aún otro objeto es proporcionar una formulación de ensayo en la que se incluye una composición que requiere para la reacción un estado de pH ácido, que es estable, y en la que son compatibles sus constituyentes químicos.

5 Otro objeto de la invención es proporcionar un dispositivo estable de ensayo, en el que un miembro vehículo, sujeto a degradación por ácidos, es impregnado de una composición de ensayo que requiere un ambiente de pH ácido, así como de medios que proporcionan a dicha com-
10 posición de ensayo un ambiente de pH ácido, pero sólo al entrar en contacto con una solución acuosa.

Otros objetos aparecerán por la exposición siguiente, y las reivindicaciones adjuntas.

Se ha hallado ahora que se pueden conseguir los
15 anteriores objetos utilizando, como medio para crear el ambiente de pH ácido, en una composición o dispositivo de ensayo, un aducto sólido de una sal de Friedel-Crafts y una base de Lewis orgánica. Estos aductos, por contacto con el fluido acuoso que se está ensayando, son hidroliza-
20 zados, desprendiendo un ácido mineral que produce el estado de pH ácido requerido. El uso de este tipo de reactivos hace posible proporcionar un ácido mineral (en vez de orgánico) para el sistema de ensayo, usando sólo reactivos sólidos. También hace posible proporcionar tal ácido sólo
25 en el momento de utilizar la composición de ensayo.

Las sales de Friedel-Crafts usadas son las sales de halógeno empleadas como catalizadores en la clásica reacción de alcoholación de Friedel-Crafts. Entre tales compuestos se incluyen, entre otros, el cloruro estánico, tricloruro de boro, cloruro de aluminio, trifluoruro
30



de boro, cloruro de cinc y cloruro férrico. Estos compues-
tos son materiales extremadamente reactivos, y muchos
producen humos cuando se exponen a una atmósfera húmeda.

Las sales de Friedel-Crafts antes indicadas se
5 hacen reaccionar con una base de Lewis orgánica, formando
los aductos sólidos de la presente invención. Entre las
bases de Lewis orgánicas de la presente invención se inclu-
yen, entre otras, la piridina y piridinas sustituidas,
tal como la alfa-, beta- y gamma-picolina, N,N-dialcoholil-
10 alcanolamidas, por ejemplo, dimetilformamida y dimetilace-
tamida, otras amidas e imidas, por ejemplo, benzamida y
succinimida, ureas tales como sim-dimetilurea, éteres ta-
les como dioxano y tetrahidrofurano, nitrilos tales co-
mo acetonitrilos, y aminas, por ejemplo, morfolina.

15 Debido a la reactividad de las sales de Friedel-
Crafts, la preparación de los aductos de la presente in-
vención requiere usualmente mezclar los constituyentes ob-
servando las precauciones necesarias para una reacción
exotérmica, y recuperar el aducto así formado. Si es ne-
20 cesario, los reaccionantes pueden ser calentados suavemen-
te, para acelerar la formación del aducto sólido.

La relación molar entre la sal de Friedel-Crafts
y base de Lewis, en la formación de los aductos de la
presente invención, depende en gran parte de la sal con-
25 cretamente usada. Por ejemplo, el boro, que tiene un ín-
dice de coordinación igual a 4, formará aductos 1:1 con
la base de Lewis, mientras que el estaño, que tiene un
índice de coordinación igual a 6, formará aductos 1:2
con la base de Lewis. Sin embargo, se puede variar esto
30 en cierto grado, según la base de Lewis orgánica concreta,



5 y la variabilidad del índice de coordinación del elemento electropositivo de la sal de Friedel-Crafts usada. Sin embargo, estas variables están dentro del alcance y ámbito experimental de las personas versadas en la técnica de la formación de complejos.

10 Los aductos de la presente invención se pueden usar solos, para comunicar el estado deseado de pH al sistema de ensayo, o se pueden incorporar en una sal neutra o débilmente ácida, para formar un sistema tampón. Tal sistema mantendrá el pH del sistema de ensayo sustancialmente isohídrico, en un estado de pH ácido predeterminado. Se pueden incluir en la composición de ensayo sales adecuadas, tal como cloruro potásico y ftalato ácido potásico, para aumentar la concentración iónica y eficacia del ácido desprendido, como sistema tampón. Cuando el ácido desprendido es ácido clorhídrico, y la sal usada juntamente con él es cloruro potásico, el medio de acidificación combinado se convierte en el bien conocido sistema tampón de Clark y Lubs, formado in situ en la composición de ensayo mediante una composición de ensayo sólida
15 seca. Tal tampón es extremadamente eficaz para tamponar la composición de ensayo, en un pH de aproximadamente 1 a 2.

25 La cantidad de aducto usado en la composición de ensayo depende del pH deseado y del efecto neutralizador de la solución que se esté ensayando, y puede ser calculado fácilmente por las personas versadas en la técnica de la química analítica. Tal cálculo se basa en la descomposición del aducto según el siguiente esquema, que se presenta simplemente como ejemplo, y varía según el aduc-
30 6.4.67 - 7 - 337747



to individual usado:



5 donde A es la base de Lewis orgánica usada para preparar el aducto. Así, se desprenden tres moles de ácido clorhídrico por cada mol de aducto usado en la anterior reacción.

10 Los aductos de la presente invención se pueden utilizar en la composición de ensayo simplemente mezclando con los otros constituyentes, para formar un polvo mezclado que, a su vez, se puede usar añadiéndole al fluido acuoso a ensayar, para a ensayar, para producir el estado de pH ácido, y detectando la consiguiente respuesta química a la presencia de la sustancia. El polvo mezclado puede ser también granulado, o se le puede dar forma
15 de tabletas, para mayor conveniencia de su uso.

Otra forma de uso implica la impregnación o incorporación del aducto en o sobre un miembro vehículo. Esto se puede hacer mezclando el aducto con los otros constituyentes, y disolviendo la mezcla en un disolvente no acuoso adecuado. Luego se puede sumergir en la solución resultante un miembro vehículo absorbente, retirar de ella, y secar. Si la composición de ensayo es tal que los
20 constituyentes no son solubles en un disolvente común, se puede emplear una técnica de impregnación en secuencia. Esta técnica comprende el uso de una serie de soluciones, conteniendo cada una algunos de los constituyentes de la composición de ensayo. El miembro vehículo es sumergido en secuencia en las soluciones, y secado para eliminar el disolvente entre las impregnaciones, El disolvente de
25 la composición de ensayo que contiene el aducto de la pre-

30

14 ABR 1967

sente invención ha de ser no acuoso, de manera que la hidrólisis, con el consiguiente desprendimiento de ácido mineral, no tenga lugar por contacto del aducto con él. Entre los disolventes adecuados se incluye el cloroformo, 5 tetracloruro de carbono, sulfóxido de dimetilo, alcoholes anhidros y acetona. Dado que la solubilidad de los aductos de la presente invención es variable, también variará la aplicabilidad del anterior disolvente, y cada disolvente de aducto se ha de elegir sobre la base de sus propiedades físicas y químicas individuales. 10

Otra forma de usar el aducto de la presente invención en unión con un miembro vehículo comprende la impregnación de un área de una tira absorbente con el aducto, y otra área de ella con el resto de la composición de 15 ensayo. Por ejemplo, la porción final de una tira absorbente puede ser impregnada con el aducto, y un área contigua, hacia el interior, puede ser impregnada con el resto de la formulación de ensayo. Cuando la porción impregnada, del extremo de la tira, es sumergida en un fluido 20 acuoso y sacada de él, el aducto de dicha porción de la tira es hidrolizado, formando un ácido mineral que, junto con el fluido absorbido, fluye al área contigua, donde reacciona con el resto de la formulación de ensayo. Constituyendo así el dispositivo de ensayo, el fluido que 25 se está ensayando es acidificado antes de su reacción con el reactivo de ensayo.

Además de los ingredientes de composición de ensayo antes indicados, es decir, del sistema de reactivo de ensayo activo, incluyendo el aducto, se pueden utilizar 30 otros coadyuvantes para perfeccionar la reactividad,



aspecto y capacidad de formulación, y la manufactura de la forma física de la composición de ensayo.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos, pero no se pretende limitarla de esta forma.

EJEMPLOS 1 a 15

En los siguientes ejemplos 1 a 15, se prepararon los aductos de la Tabla 1, y se combinaron 25 partes con 1 parte de p-dimetilaminobenzaldehído, formando una mezcla pulverulenta seca. Se añadió aproximadamente 0,5 g. de esta mezcla a 2 ml de una solución acuosa de mesobilirrubinógeno^a, que tenía 1 mg/ml. En todos los ejemplos se formó inmediatamente en la solución un color rosa.

337747

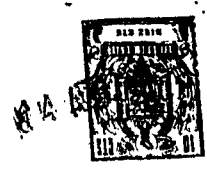


TABLA I

<u>Ejem- plo</u>	<u>Sal de Friedel-Crafts</u>	<u>Base de Lewis orgá- nica</u>	<u>Relación entre sal y base</u>
1	Tricloruro de boro	Piridina	1:1
2	Tricloruro de boro	Alfa-picolina	1:1
3	Tricloruro de boro	Beta-picolina	1:1
4	Tricloruro de boro	N,N-dimetilformamida	1:1
5	Tricloruro de boro	N,N-dimetilacetamida	1:1
6	Tricloruro de boro	Sim-dimetilurea	1:1
7	Tricloruro de boro	Benzamida	1:1
8	Tricloruro de boro	Succinimida	1:1
9	Tricloruro de boro	Dioxano	1:1
10	Tricloruro de boro	Tetrahidrofurano	1:1
11	Tricloruro de boro	Acetonitrilo	1:1
12	Cloruro estánnico	Piridina	1:2
13	Cloruro estánnico	Morfolina	1:2
14	Cloruro estánnico	Dioxano	1:2
15	Cloruro estánnico	Tetrahidrofurano	1:2

• Se sabe que el mesobilirrubinógeno y urobilinógeno se comportan de la misma forma con el sistema de ensayo antes descrito. Por tanto, los ejemplos 1 a 15 son aplicables a un ensayo de urobilinógeno, así como a un ensayo de mesobilirrubinógeno.

337747

Ejemplo 16



Se prepararon las siguientes soluciones:

Primera solución:

Fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	5,0 g
Agua	150,0 ml

Segunda solución:

Aducto de cloruro estánnico-dioxano ^M	5,0 g
Sulfóxido de dimetilo	17,5 ml.
Cloroformo	2,5 ml.
p-dimetilaminobenzaldehído	100,0 mg

^MPreparado mezclando aproximadamente 1 mol de dioxano con 2 moles de cloruro estánnico.

Luego se sumergió papel de filtro Eaton and Dikeman n^o 641 en la primera solución, se sacó y se dejó escurrir y secar a 100°C durante de 10 a 11 min. Después se sumergió el papel seco en la segunda solución, y se volvió a secar a 100°C durante de 10 a 12 minutos. Luego se cortó el papel impregnado en pequeños cuadrados que se unieron al extremo de unas tiras de películas plástica de poliestireno, transparente y flexible, de aproximadamente 0,5 x 8 cm.

Los dispositivos de ensayo así preparados se sumergieron en orina que contenía 5 mg% de urobilinógeno, y se secaron. El papel de filtro impregnado tomó inmediatamente un color rosa.



Ejemplo 17

Se preparó un aducto de cloruro estánnico y dioxano, como en el Ejemplo 16, y 100 mg del mismo fueron disueltos en 10 ml de una solución al 0,1% (peso/volumen) de azul de tetrabromofenol en alcohol etílico.

5 las porciones de los extremos de las tiras de papel de filtro fueron sumergidas en esta solución, sacadas, dejadas escurrir y secar a temperatura ambiente. La porción impregnada seca de la tira de papel de filtro tenía un color de ante rosáceo. Luego se sumergieron las tiras por separado, en soluciones acuosas de albúmina que tenían
10 concentraciones diversas, que variaban entre 0 y 1000 mg%, y se secaron inmediatamente. La tira sumergida en el agua que contenía albúmina adoptó un color ligeramente verdoso, mientras que la tira que estaba en contacto con la
15 solución de 1000 mg % de albúmina adoptó un color azul oscuro. Las tiras que se pusieron en contacto con soluciones de 30, 100 y 300 mg % de albúmina adoptaron tonos intermedios de azul-verde, volviéndose más azules que verdes las tiras que se pusieron en contacto con las soluciones
20 de albúmina de mayor concentración.

Ejemplo 18

Se repitió el Ejemplo 17, salvo en que el alcohol etílico se substituyó por sulfóxido de dimetilo, como disolvente del sistema de reactivo de ensayo. Los resultados fueron sustancialmente iguales a los del Ejemplo 17,
25 salvo en que el cambio de color al entrar en contacto con



la proteína (albúmina) fué de amarillo a verde.

Ejemplo 19

Se repitió el Ejemplo 17, salvo en que se usó acetona como disolvente para el sistema de reactivo de ensayo. Las tiras de ensayo fueron blancas, según se prepararon, y el cambio de color, al entrar en contacto con las soluciones de albúmina, fué de blanco a verde, a través de diversos tonos de amarillo-verde.

Ejemplo 20

Se preparó una solución de 1 g de sulfato férrico amónico, $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, y 1,5 g de sulfato de magnesio, MgSO_4 , en 15 ml de agua destilada, y se sumergieron en ella las porciones de los extremos de unas tiras de papel de filtro, que luego se sacaron y se secaron a 105°C durante 10 min. Los extremos impregnados de las tiras secas se sumergieron luego en una solución al 1% (peso/volumen) de aducto de cloruro estánnico-dioxano, en sulfóxido de dimetilo. El aducto se preparó como en el Ejemplo 16. Se volvieron a secar las tiras a 105°C durante 10 min. Se preparó una serie de soluciones acuosas que contenían 0, 15, 40 y 100 mg de fenilpiruvato sódico, y se sumergieron en ellas, por separado, las porciones de los extremos de las tiras secas. Según la cantidad de fenilpiruvato presente en la solución, la tira cambió de amarillo a grisáceo, permaneciendo amarilla la tira que se puso en contacto con la solución que no



contenía fenilpiruvato.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 11 de Marzo de 1.966 bajo el núm. 10361/66, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Método de ensayo, para detectar una sustancia en un fluido acuoso, que comprende combinar con una composición que puede reaccionar específicamente con dicha sustancia, pero solo en un ambiente de pH ácido, un aducto sólido de una sal de Friedel-Crafts y una base de Lewis orgánica, que, por contacto con un fluido acuoso, se puede hidrolizar formando un ácido mineral que proporciona un ambiente de pH ácido para dicha composición.

2.- Método de ensayo según la reivindicación 1, en el que la formulación comprende además una sal neutra o débilmente ácida, para aumentar la capacidad tamponadora del ácido mineral formado a partir del aducto.

3.- Método de ensayo según la reivindicación 1, donde la sal de Friedel-Crafts se elige del grupo que consta de cloruro estánnico, tricloruro de boro, cloruro



de aluminio, trifluoruro de boro, cloruro férrico y cloruro de cinc.

4.- Método de ensayo según la reivindicación 1, donde la base de Lewis orgánica se elige del grupo que consta de aminas, amidas, imidas, ureas, éteres cíclicos y nitrilos.

5.- Método de ensayo según la reivindicación 1, donde la base de Lewis se elige del grupo que consta de piridina, alfa-picolina, beta-picolina, gamma-picolina, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, sim-dimetilurea, benzanida, succinimida, dioxano, tetrahidrofurano, acetonitrilo y morfolina.

6.- Método de ensayo según la reivindicación 1, donde la sustancia con la que puede reaccionar específicamente la composición se elige del grupo que consta de urobilinógeno, bilirrubina, mesobilirrubinógeno, fenilpiruvato y proteína.

7.- Un dispositivo para ensayo para detectar una sustancia en un fluido acuoso, que comprende un miembro vehículo y una formulación de ensayo seca sobre dicho vehículo, comprendiendo dicha formulación una composición que puede reaccionar específicamente con dicha sustancia, pero solo en un ambiente de pH ácido, y un aducto sólido de una sal de Friedel-Crafts y una base de Lewis orgánica, que, por contacto con un fluido acuoso, se puede hidrolizar formando un ácido mineral que proporciona un ambiente de pH ácido para dicha composición.

8.- Dispositivo para ensayo según la reivindicación 7, donde la formulación de ensayo comprende además una sal neutra o débilmente ácida, para aumentar la capa-



idad tamponadora del aducto.

9.- Dispositivo para ensayo según la reivindicación 7, donde la sal de Friedel-Crafts se elige del grupo que consta de cloruro estánnico, tricloruro de boro, cloruro de aluminio, trifluoruro de boro, cloruro férrico y cloruro de cinc.

10.- Dispositivo para ensayo según la reivindicación 7, donde la base de Lewis se elige del grupo que consta de aminas, amidas, imidas, ureas, éteres cíclicos y nitrilos.

11.- Dispositivo para ensayo según la reivindicación 7, donde la base de Lewis se elige del grupo que consta de piridina, alfa-picolina, beta-picolina, gamma-picolina, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, sim-dimetilurea, benzamida, succinimida, dioxano, tetrahidroturano, acetonitrilo y morfolina.

12.- Dispositivo para ensayo según la reivindicación 7, donde la sustancia con la que puede reaccionar específicamente la composición se elige del grupo que consta de urobilinógeno, bilirrubina, mesobilirrubinógeno, fenilpiruvato y proteína.

13.- Método para crear in situ un ambiente de pH ácido para una composición de ensayo para detectar una sustancia en un fluido acuoso, que comprende poner en contacto con un fluido acuoso dicha composición de ensayo y un aducto sólido de una sal de Friedel-Crafts y una base de Lewis orgánica, que, por contacto con dicho fluido se puede hidrolizar formando un ácido orgánico.

14.- Método según la reivindicación 13, donde el fluido acuoso contiene además una sal neutra o débil-



mente ácida, para aumentar la capacidad tamponadora del ácido mineral formado a partir del aducto.

15.- Método según la reivindicación 13, donde la sal de Friedel-Crafts se elige del grupo que consta de cloruro estánnico, tricloruro de boro, cloruro de alu-
5 de cloruro estánnico, tricloruro de boro, cloruro de alu-
minio, trifluoruro de boro, cloruro férrico y cloruro de cinc.

16.- Método según la reivindicación 13, donde la base de Lewis se elige del grupo que consta de aminas,
10 amidas, imidas, ureas, éteres cíclicos y nitrilos.

17.- Método según la reivindicación 13, donde la base de Lewis se elige del grupo que consta de piridi-
na, alfa-picolina, beta-picolina, gamma-picolina, N,N-di-
15 metilformamida, N,N-dimetilacetamida, sim-dimetilurea,
benzamida, succinimida, dioxano, tetrahidrofurano, ace-
tonitrilo y formolina.

18.- Un dispositivo para ensayo para detectar una sustancia en un fluido acuoso.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de dieciocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

14 ABR 1967

Madrid,

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder

337747

JJV.

- 18 -

10.4.67