



Cas G.266

360,241

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

por "UN PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO PARA LA PREPARACION DE ISORRENIERATENOS", a favor de la firma italiana SOCIETA' FARMACEUTICI ITALIA, residente en MILANO (Italia)

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de productos con acción pigmentante.

Más particularmente, este invento se refiere a un procedimiento microbiológico para la preparación de

5. isorrenieratenos, de la clase constituida por el isorrenieratenos, el 3-oxi-isorrenieratenos y el 3,3'-dioxi-isorrenieratenos, por medio del nuevo microorganismo Streptomyces mediolani.

- El isorrenieretano es un producto conocido, descrito en la literatura por Yamaguchi, Bull. Chem. Soc. Japan
10. 1957, 30, pág. 111, y también se conocen el 3-oxi-isorreniera-



teno y el 3,3'-dioxi-isorrenierateno, descritos y reivindicados en la patente belga nº 687.906.

Los productos en cuestión, y particularmente el 3-oxi- y el 3,3'-dioxi-isorrenierateno, tienen gran acción pigmentante y a causa de ello se usan en zootécnia.

Estos productos pueden prepararse, según la literatura, por medio de síntesis químicas bastante complicadas.

Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, un procedimiento microbiológico para la preparación de estos compuestos, el cual, además de dar buenos rendimientos, es mucho más sencillo y económicamente más ventajoso que la síntesis químicas conocidas.

En efecto, para el uso en zootécnica de los productos así obtenidos, no hay necesidad de efectuar la separación y la purificación de ellos, sino que puede emplearse directamente como aditivo a las dietas comunes de los animales el micelio "in toto", que contiene los productos pigmentantes.

El Streptomyces mediolani, clasificado como raza 2215/74 F.I. de la Farmitalia, ha sido depositada en el Instituto de Patología Vegetal de la Universidad de Milan, donde ha recibido el número I.P.V. 1952, y en el Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, en el que ha recibido el número I.M.I. 134.886.



El microorganismo presenta los caracteres morfológicos, microscópicos y bioquímicos siguientes:

Aspecto microscópico

- En los terrenos de cultivo comunes, el micelio vegetativo está formado por hifas más o menos delgadas, de
5. 0,4 a 0,9 micras de espesor, largas y abundantemente ramificadas, que originan hifas mayores, de 1 a 1,3 micras de espesor, largas y rectas. De estas últimas hifas se ramifican monopodialmente hifas que forman esporas o esporóforos,
10. las cuales son rectas o ligeramente sinuosas, largas, formadas por pequeñas cadenas de esporas que primero están unidas y luego están libres. Las esporas tienen forma lisa, predominantemente cúbica a veces también cilíndrica y redondeada. En el examen microscópico aparecen como cubitos característicos que miden 0,9-1,1 por 0,9-1,1 micras.
- 15.

Aspecto macroscópico

- En la tabla 1 se exponen las propiedades de cultivo advertidas en los terrenos respectivos, en los cuales el microorganismo se hace crecer a 28°C y las observaciones se efectúan al cabo de 3, 8, 15 y 20 días de la inoculación.
- 20.

El microorganismo presenta en esencia un desarrollo rápido y abundante, con formación de un micelio vegetativo compacto, consistente, de patina lisa y color de amarillo de huevo a amarillo anaranjado. El micelio aéreo es también



- abundante en todos los terrenos de cultivo, con un aspecto más bien algodonoso, de color amarillo vainilla a amarillo rosado o amarillo beige. No se observan diferencias notables en el aspecto del microorganismo cuando se desarrolla en
5. terrenos sintéticos o en terrenos orgánicos.

Propiedades bioquímicas

- Proteólisis de gelatina: positiva.
- Reducción de los nitratos a nitritos: positiva.
- Hidrólisis del almidón: positiva.
10. No coagula la leche, sino que la peptoniza.
- Producción de melamina: negativa.
- Descomposición de la tirosina: positiva.
- Producción de hidrógeno sulfurado: positiva.
- El microorganismo no produce pigmentos solubles.
15. Utiliza las fuentes de carbono siguientes: glucosa, l-arabinosa, sacarosa, d-xilosa, d-manitol, d-fructosa, maltosa, ramnosa y glicerina; en cambio, no utiliza el meso-inositol y la rafinosa.
- El microorganismo no se desarrolla a 50°C y no produce esclerosios. En cultivo líquido sumergido y agitado, produce isorrenierateno, 3-oxi-isorrenierateno y 3,3'-dioxi-isorrenierateno.
- 20.



Tabla 1

Terreno	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio vegetativo	Pigmento soluble
Agar de Bennet (1)	abundante, en patina lisa	abundante, ligeramente algodonoso, de color amarillo vainilla con matices de beige o rosado.	amarillo de huevo o amarillo de albaricoque; envés idéntico	ausente
Agar de Czapeck (1)	moderado, en patina lisa	abundante, algodonoso; de color amarillo vainilla con matices de gris-beige	amarillo de limón a amarillo de albaricoque; envés idéntico	ausente
Agar-asparagina-glucosa (1)	abundante, en patina lisa	moderado, de color amarillo vainilla liso	amarillo de limón; envés idéntico	ausente
Agar-glicerina-glicina (1)	abundante, en patina ligeramente plegada	abundante, algodonoso; de amarillo rosado a beige neto	amarillo de albaricoque; envés idéntico	ausente
Agar de Emerson (1)	abundante, en patina arrugada	abundante, raso de color blanco crema	amarillo anaranjado; envés idéntico	ausente
Agar-almidón y sales (2)	abundante, en patina lisa	abundante, algodonoso; de amarillo rosado a beige claro	amarillo anaranjado; envés idéntico	ausente



Tabla 1 (continuación)

Agar-pa tata (4)	abundante, en patina lisa	abundante, de pulve rulento a algodono so; amarillo rosado con matices de bei ge claro	amarillo anaran jado; envés idén tico	ausente
Agar-ave na (3)	abundante, en patina lisa	abundante, bastante raso, pulverulento; amarillo rosado pol voroso	amarillo anaran jado claro; en ves idéntico	ausente
Agar-as paragina glicerol (1)	abundante, en patina lisa	abundante, algodono so; de rosa polvorien to a beige claro	amarillo anaran jado; envés idén tico	ausente
Agar-glu cosa-ex tracto de leva dura (1)	abundante, en patina lisa	abundante, ligeramen te algonoso; de amarillo vainilla a beige claro	amarillo anaranja do; envés idén tico	ausente
Agar- peptona almidón (1)	abundante, en patina lisa	abundante, algodono so; de amarillo a beige claro	amarillo anaranja do; envés idén tico	ausente
Agar- peptona nitrato potásico	abundante, en patina lisa	moderado, rosado; amarillo vainilla con tonalidades rosadas polvorientas	amarillo anaranja do claro; envés idéntico	ausente



- (1) Waksman S.A., "The Actinomycetes", vol. II, 1961, páginas 328-334.
- (2) Pridham T.G. y col., Antibiotics Annual, 1956-1957, páginas 947-953
5. (3) Baldacci E. y col., Giorn. Microbiol, 9, pág. 39, 1961.
- (4) Grein A. y col., Giorn. Microbiol, 13, pág. 299, 1965.

Identificación del microorganismo

- Las propiedades que presenta el microorganismo en examen y que se han descrito precedentemente permiten
10. referirlo al género Streptomyces Waksman et Henrici (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957, pág. 774-775).

- El microorganismo pertenece a la sección "Rectus-flexibilis", serie "amarilla" de Pridham y col. (Appl. Microbiol, 6, 1968, pág. 52). Los colores del micelio vegetativo y del micelio aéreo no permiten referirlo a ninguno
15. de los grupos subgenéricos más conocidos propuestos por Waksman (The Actinomycetes, vol. II, pág. 117, 1961), por Baldacci (Giorn. Microbiol. 6, 1958, pág. 10), por Gause y col. (Zur Klassifizierung der Actinomyceten, 1958, pág. 17),
 20. por Flaig y col. (Arch. Mikrobiol. 35, 105, 1960) y por Ettliger y col. (Arch. Mikrobiol. 31, 326, 1958).

Una comparación entre las propiedades del microorganismo en examen y las manifestadas en la literatura para



las especies pertenecientes a la serie "amarilla" de Pridham y col. ha demostrado que ninguna de éstas tiene todas las propiedades correspondientes a las del microorganismo en examen.

5. Se concluye pues de cuanto se ha expuesto antes que el microorganismo en examen no puede identificarse con ninguna de las especies descritas en la literatura y por consiguiente es considerado como una nueva especie y ha sido llamado Streptomyces mediolani.

10. El Streptomyces mediolani puede conservarse por inoculaciones sucesivas en terrenos sólidos, o por liofilización de una suspensión de sus esporas en leche.

15. El procedimiento según este invento consiste en cultivar el nuevo microorganismo Streptomyces mediolani en cultivo sumergido, en un terreno de cultivo que contenga fuentes de carbono, de nitrógeno y de sales minerales. Más particularmente, el microorganismo se cultiva en un medio de cultivo líquido, en condiciones aeróbicas, a temperatura entre 24°C y 37°C (preferentemente, a 27°C) y por un período de 72 a 160 horas. El pH puede variar de 6 a 8 según el terreno empleado.

20. Como fuente de carbono puede utilizarse glucosa, dextrina, almidón, diversas harinas (harina de maíz, de soja, de trigo, etc.), corn steep liquor y otras sustancias de uso común.

25.



La fuente de nitrógeno, aparte de las sustancias complejas ya mencionadas que contienen nitrógeno, puede ser caseína, harina de semillas de algodón y sales amónicas, como sulfato, fosfato y cloruro de amonio y otras sustancias de uso común.

Las sales minerales útiles para la producción de los carotenoides varían según el terreno empleado.

Por ejemplo, se pueden emplear cloruros, sulfatos o fosfatos de sodio, de potasio, de magnesio, de hierro, de zinc, de cobre y de cobalto, carbonato de calcio y otras sustancias de uso corriente. La fermentación puede efectuarse en matraces o en fermentadores de laboratorio o industriales de diversa capacidad. Una vez terminada la fermentación, se separa el micelio, por filtración o por centrifugación, del caldo de cultivo y los productos pigmentantes contenidos se aíslan por extracción con un disolvente orgánico apropiado, miscible o no miscible en agua, tal como etanol, cloroformo, acetona o cloruro de metileno. La separación de cada producto se efectúa por cromatografía según técnicas conocidas.

Los productos obtenidos por el procedimiento de este invento puede emplearse en zootécnica y su gran poder pigmentante ha demostrado ser particularmente útil cuando se los administra a las aves de corral.

Los productos se añaden tales como son o en mezcla



con alimentos; de preferencia, puede emplearse directamente el micelio obtenido del proceso fermentativo. En el primer caso se mezcla el producto pigmentado con uno de los ingredientes de la dieta utilizada corrientemente en la alimentación.

5. Si se utiliza el micelio separado del caldo de cultivo, se le seca con aire caliente o en vacío y luego se le muele.

10. El polvo así obtenido se mezcla a fondo con el alimento usado corrientemente. La cantidad de producto pigmentante que se añade a los alimentos puede variar según la pigmentación que se desee y según la presencia optativa de elementos pigmentantes naturales. De preferencia, puede variar de 0,3 a 6 g por quintal de alimento.

15. La acción pigmentante de los productos obtenidos por el procedimiento de este invento se ha determinado a base de la intensidad de color de las yemas de huevo medida según la escala colorimétrica "Roche" (véase Mainguy P. y col., "La couleur vitelline", Ed. Hoffmann-La Roche).

20. La prueba se ha efectuado sobre 30 gallinas ponedoras de 7 meses de edad, cada una en jaula individual y divididas en tres grupos de 10; el tratamiento se efectuó según el esquema siguiente:



- | <u>Grupo</u> | <u>Tratamiento</u> |
|--------------|---|
| 1 | Dieta básica que contenía una pequeña cantidad de pigmentos totales correspondiente a 13,89 mg/kg. |
| 2 | Dieta básica + alfalfa deshidratada correspondiente a un contenido de pigmentos totales de 1500 mg/quintal de mezcla. |
| 5. | Dieta básica + micelio correspondiente a un contenido de pigmentos totales de 1500 mg/quintal de mezcla. |
| 3 | Dieta básica + micelio correspondiente a un contenido de pigmentos totales de 1500 mg/quintal de mezcla. |
| 10. | La composición de la dieta básica fue la siguiente:
(los valores indican los porcentajes en peso) |
| | maíz híbrido 39,00 |
| | avena 17,60 |
| | salvado de trigo 12,00 |
| 15. | harina de soja al 44% 15,00 |
| | harina de carne 3,00 |
| | harina de pescado 3,00 |
| | levadura de tórula 1,00 |
| | dl-metionina 0,10 |
| 20. | fosfato sódico 0,70 |
| | carbonato cálcico 6,30 |
| | cloruro sódico 0,30 |
| | manteca de cerdo 1,00 |
| | Farcomplex (Marca registrada) 1,00 |
| 25. | El "Farcomplex" es una mezcla de vitaminas y oligoelementos que tiene la composición siguiente (las fibras se |



refieren a 1 kg de la propia mezcla

	Vitamina A protegida	750.000 U.I.
	Vitamina D ₃ protegida	150.000 U.I.
	Vitamina E protegida	500 U.I.
5.	Vitamina B ₂	0,4 g
	Vitamina B ₁₂	0,0024 g
	Vitamina K ₃	0,1 g
	Vitamina PP	2,5 g
	Acido fólico	0,015 g
10.	d-pantotonato cálcico	1 g
	dl-metionina	40 g
	Cloruro de colina	100 g
	Clorhidrato de clorotetraciclina	2 g
	Yodo	0,1 g
15.	Manganeso	7 g
	Zinc	5 g
	Hidroxibutiltolueno	10 g
	Factores desconocidos del crecimiento hasta 1000 g	

20. En los grupos 2 y 3 citados, la alfalfa deshidratada y el micelio se substituyeron por cantidades análogas de salvado de trigo. La prueba, que duró 30 días, se dividió en dos períodos:

- 1) período peexperimental (10 días), durante el cual todos los sujetos se alimentaron "ad libitum" con la dieta
25. básica desprovista de alfalfa;



2) período experimental (19 días), en el cual los sujetos se alimentaron tal como se ha descrito antes.

Durante el período experimental y a días alternos se evaluó la pigmentación de la yema de huevo; en la tabla 2

5. que sigue se exponen los resultados mínimos, medios y máximos que se obtuvieron.

TABLA 2

10.	Grupos	Periodo experimental		
		Escala Roche		
		Minimo	Promedio	Máximo
15.	1	7,00	7,30	7,80
	2	7,46	8,45	9,14
	4	7,06	9,99	11,88

Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar el
20. invento, pero sin limitarlo.



EJEMPLO 1

Se separa la superficie esporulada de un cultivo de Streptomyces mediolani de 10 días de edad, desarrollado en tubo de ensayo sobre agar-patata glucosado, a 28°C, y se
5. la recoge en 4 cc de agua destilada estéril. De esta suspensión se utilizan 0,5 cc para inocular un matraz de 300 cc que contiene 60 cc del terreno siguiente:

	Dextrina	4%
	Caseina	1%
10.	Carbonato cálcico	0,5%
	Sulfato amónico	0,1%
	Fosfato bipotásico	0,01%
	Corn steep liquor	1%
	Agua del grifo hasta 100 cc	

15. La esterilización se efectúa calentando en autoclave a 120°C por 20 minutos.

El pH del terreno es de 6,9 después de la esterilización.

20. Se incuba el matraz a 28°C por 26 horas en un agitador giratorio con 225 r.p.m. y 3 cm de excentricidad.

2 cc de un cultivo así obtenido se utilizan para inocular matraces de 300 cc que contienen 60 cc del mismo terreno, esterilizado tal como se ha descrito antes. Se incuba en las mismas condiciones anteriores.



Al cabo de 120 horas de fermentación, se alcanza una producción de 500 gammas de productos pigmentados por cc de caldo de cultivo.

EJEMPLO 2

5. Se procede como en el Ejemplo 1, con la diferencia de que el terreno empleado para la fase productiva tiene la composición siguiente:

	Almidón insoluble	4,5%
	Harina de soja	2,25%
10.	Corn steep liquor	2,35%
	Cloruro sódico	0,5%
	Carbonato cálcico	0,35%
	Agua del grifo hasta 100 cc.	

15. Después de 120 horas de fermentación, se alcanza una producción de 600 gammas de productos pigmentantes por cc de caldo de cultivo.

EJEMPLO 3

20. Se procede como en el Ejemplo 1, con la diferencia de que el terreno empleado para la fase productiva tiene la composición siguiente:

	Glucosa	0,3%
--	---------	------



	Harina de semillas de algodón	0,4%
	Almidón soluble	7%
	Carbonato cálcico	1,2%
	Sulfato amónico	0,75%
5.	Corn Steep liquor	2,35%
	Agua del grifo hasta 100 cc	

Al cabo de 120 horas de fermentación, se alcanza una producción de 900 gammas de productos pigmentantes por cc de caldo de cultivo.

10. EJEMPLO 4

Se procede como en el Ejemplo 1, pero con la diferencia de que el terreno empleado para la fase productiva tiene la composición siguiente:

	Almidón soluble	4%
15.	Caseina	1%
	Harina de soja	3%
	Melasa de remolacha	0,2%
	Carbonato cálcico	0,4%
	Sulfato magnésico	0,1%
20.	Agua del grifo hasta 100 cc	

Al cabo de 69 horas de fermentación, se alcanza una producción de 700 gammas de productos pigmentantes por cc de caldo de cultivo.



EJEMPLO 5

Con un cultivo de Streptomyces mediolani de 20 días de edad, desarrollado en el terreno y en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1, se inoculan

5. tres matraces de 300 cc que contienen 60 cc del terreno descrito en el Ejemplo 1.

Se incuba a 28°C por 26 horas en las mismas condiciones del Ejemplo 1.

170 cc del caldo de cultivo así obtenido se inoculan en 3000 cc del mismo terreno líquido, contenidos en un fermentador de 5 litros provisto de un agitador de hélice, de tubo de admisión para burbujear aire, que termina debajo de la hélice del agitador, de fragmentador de corriente, de tubos de inoculación, de tubos para la salida del aire

10. y de equipo para comprobar la temperatura.

15.

La operación se efectúa a 28°C, con un régimen de aireación de 3 litros por minuto y con una agitación de 400 r.p.m. Durante la fermentación se reprime la formación de espuma añadiendo pequeñas cantidades de agente antiespumante de silicona.

20.

El rendimiento máximo de productos pigmentantes se obtiene al cabo de 77 horas de fermentación y es de 500 gammas por cc de caldo de cultivo.

Se filtran 10 litros del caldo de cultivo con



2% de Hyflo Supercel (marca comercial registrada) y se desecha el filtrado. Se suspende el micelio, a la temperatura ambiente, en 3 litros de metanol y se sacude; luego se efectúan tres extracciones con 3 litros de una mezcla de

5. metanol-cloroformo (1:1) cada vez.

Los extractos combinados se lavan repetidamente con agua y la fase clorofórmica separada se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío a 35°C. El residuo oleoso, de color rojo oscuro, consta de un complejo de pigmentos.

10. Se recoge este residuo con éter de petróleo (300 cc) y se separa por filtración un sólido de color rojo pardusco, que pasa 1,5 g. Se concentran las aguas madres etéreas hasta unos 100 cc y se las cromatografía sobre una columna de alúmina neutra, primeramente por elución con éter de petróleo, para
15. eliminar las grasas, y luego con éter de petróleo que contiene 1% de acetona. Se concentra hasta volumen reducido el eluato de la banda grande de cabeza y se le deja reposar durante la noche en un refrigerador; se separan 400 mg de producto cristalino, rojo púrpura, fundente a 200-201°C y con
20. máximos de adsorción en el espectro visible en las longitudes de onda siguiente (fracción A).

<u>Disolvente</u>	<u>λ_{max} (milimicras)</u>
Eter de petróleo	(428), 448, 478
Benceno	(440), 465, 495

25. Por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice



- se ha comprobado: $R_f = 0,85$ (benceno) y $R_f = 0,38$ (éter de petróleo y 1% de acetona). Esta fracción A se ha identificado por lo tanto como isorrenierateno por comparación cromatográfica y espectrofotométrica y mediante punto de fusión en mezcla con una muestra preparada por síntesis. Prosiguiendo la elución de la columna con éter de petróleo que contiene 10% de acetona, se recoge una segunda banda; del eluato concentrado hasta volumen reducido se obtienen 200 mg de un polvo de color rojo ladrillo, fundente a 180-185°C y con máximos de adsorción en el espectro visible en las longitudes de onda siguientes (Fracción B):
- 5.
- 10.

<u>Disolvente</u>	<u>λ_{max} (milimicras)</u>
Eter de petróleo	(425), 446, 475
Benceno	(438), 463, 493

15. Por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice se obtiene: $R_f = 0,47$ (benceno) y $R_f = 0,7$ (cloruro de metileno).

- Esta fracción B es poco soluble en los disolventes orgánicos comunes, aunque es muy soluble en carbonato sódico alcohólico, con coloración roja brillante, y se reprecipita por acidificación.
- 20.

Mediante tratamiento con anhídrido acético en piridina, da un acetato fenólico $\left. \begin{array}{l} \text{cm}^{-1} \\ \text{KBr} \end{array} \right\} 1215, 1758$ que es insoluble en carbonato sódico alcohólico.



Esta fracción se ha identificado con el 3-oxi-
-isorrenierateno por comparación cromatográfica y espectrofo-
tométrica y mediante punto de fusión en mezcla. El sólido
color rojo pardusco (1,5 g) recogido precedentemente en éter
5. de petróleo se cromatografía en una columna de gel de sílice
y se eluye con benceno que contiene 10% de acetona. De la
banda grande de cola se obtienen, por evaporación del di-
solvente y tratamiento sucesivo con éter de petróleo, 600
10. mg de un sólido amorfo, de color rojo ladrillo, fundente a
200°C (con descomposición) y que tiene en el espectro
visible máximo de adsorción en las longitudes de onda si-
guientes (Fracción C):

<u>Disolvente</u>	<u>λ max (milimicras)</u>
Eter de petróleo	(425), 446, 475
15. Benceno	(438), 463, 493

Por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice
se obtiene: $R_f = 0,1$ (benceno) y $R_f = 0,26$ (cloruro de meti-
leno).

Esta fracción C se ha identificado con el 3,3'-
20. -dioxi-isorreinerateno por comparación cromatográfica y
espectrofotométrica y por punto de fusión en mezcla.



N O T A

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 16443, A/68 del 14 de Mayo 1968

5. 1. Un procedimiento microbiológico para la preparación de isorrenieratenos de la clase constituida por el isorrenierateno, el 3-oxi-isorrenierateno y el 3,3'-dioxi-isorrenierateno, caracterizado por cultivarse el nuevo microorganismo Streptomyces mediolani, en condiciones aeróbicas y en cultivo sumergido, en un terreno de cultivo líquido que contiene fuentes de carbono, de nitrógeno y de sales minerales y separarse del caldo de fermentación, por filtración o centrifugación, el micelio que contiene los productos pigmentantes.
10. 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por efectuarse la fermentación a temperatura de 24°C a 37°C, por un período de 72 a 160 horas y con pH entre 6 y 8.
15. 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por separarse del micelio de Streptomyces mediolani que los contiene los productos pigmentantes, por extracción, de manera conocida, con un disolvente orgánico miscible o no miscible con el agua y luego aislamiento y
- 20.



purificación por cromatografía.

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por separarse del caldo de fermentación el micelio del Streptomyces mediolani, secarse éste y molerse.
5. según métodos conocidos, para añadirlo a alimentos.

5. Un procedimiento microbiológico para la preparación de isorrenieratenos.

- Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 22 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.
- 10.

Madrid, a 14 NOV 1968

p.a.