

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

2 OSET. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES

11

21

22

NUMERO

467.652

FECHA DE PRESENTACION

8-3-1978

A1

PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
024937/77	9-3-1977	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C/25	

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO DE FABRICAR POLISACARIDOS ACIDOS DE ALTA VISCOSIDAD"

71 SOLICITANTE (S)
GPC INTERNATIONAL, INC. (PP/3149)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
International Plaza, Englewood Cliffs, Nueva Jersey 07632, EE.UU.

72 INVENTOR (ES)
Masaki Tamura, Hiroo Sasaki y Norio Matsumoto

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.411)

jga

1 Descripción detallada de la invención

5 En la presente invención se toma un microorganismo nuevo separado del terreno, *Bacillus lentus*, y se cultiva en un medio de cultivo que tiene diversos carbohidratos como fuente de carbono; luego se hace que se produzcan polisacáridos de gran viscosidad en el medio líquido de cultivo, siendo el objeto derivar polisacáridos ácidos de resistencia superior a ácidos, álcalis y calor, a partir de materiales baratos, por un método aplicable industrialmente, con facilidad y gran rendimiento.

10 Los polisacáridos, junto con ácido nucleico, proteínas y lípidos, son constituyentes que desempeñan una función vital en una familia/serie de altos polímeros de los cuerpos vivos. En virtud de sus propiedades, tales como adhesión y adherencia, los polisacáridos viscosos tienen amplia gama de aplicación, y se están llevando a uso en muchos campos, tal como aditivos para alimentos y cosméticos, agentes de apresto, estabilizadores de congelación, agentes para ayuda de suspensión, lubricantes, minería de minerales por suspensión, aditivos para lodós de perforación, recuperación de petróleo en campos de petróleo. En el campo médico se prevé amplio uso como resultado de reconocimiento, en años recientes, de la acción farmacológica de algunos polisacáridos contra tumores y contra tensión de la sangre.

25 Usualmente, la fuente de suministro de tales polisacáridos está en la flora y la fauna, de manera que el suministro para producción no era constante, y variaba mucho en calidad. En consecuencia, se ha buscado una fuente fácilmente controlable de microorganismos que puedan producir

30

270378

1 una rica variedad de polisacáridos.

Pensando en ello, los autores emprendieron una amplia búsqueda analítica de microorganismos en el mundo de la naturaleza, para obtener bacterias capaces de producir polisacáridos de gran viscosidad, a partir de materiales de partida de sacárido. Descubrieron una cepa de bacteria, el *Bacillus lentus* D-228, perteneciente al género *Bacillus*, como productor de polisacáridos ácidos viscosos que presentaban alta viscosidad a bajas densidades.

10 Sus propiedades farmacológicas son:

I. Características morfológicas

1) Forma de las células vegetativas: varillas (0,6-0,8 μ x 1,2-3,0 μ) sin formación de células en cadena.

2) Esporas y esporangios: endosporas elípticas (0,7-0,9 μ x 1,2-3,0 μ), posición central o delantera.

20 Esporangios no distendidos perceptiblemente.

3) Motilidad: mótil

4) Flagelos: peritriquiales

25 5) Mancha gram: positiva

6) Resistencia a ácido: negativa

II. Características de cultivo

1) Cultivo inclinado en caldo de agar: ligero crecimiento

30

- | | | |
|----|--|---|
| 1 | 2) Cultivo inclinado en caldo de agar glucosa: | crecimiento moderado, pero se producen polisacáridos viscosos en gran cantidad: |
| 5 | 3) Cultivo inclinado en glucosa casaminoácidos: | crecimiento menos que moderado; alguna producción de polisacáridos viscosos |
| 10 | 4) Cultivo inclinado en glucosa-proteosa peptona agar: | crecimiento menos que moderado; alguna producción de polisacáridos viscosos |

III. Características fisiológicas

- | | | |
|----|---|--------------|
| 15 | 1) Licuación de gelatina | : - |
| | 2) Hidrólisis de caseína | : - |
| | 3) Formación de indol | : - |
| 20 | 4) Formación de amoníaco (peptona-agua y medio de cultivo semisólido de arginina de Sonley) | : - |
| 25 | 5) Formación de sulfuro de hidrógeno (medio de cultivo de cisteína peptona y medio de cultivo de agar de hierro de Kligler) | : - |
| | 6) Ureasa | : + |
| | 7) Reducción de sales nitrato | : diminuta |
| | 8) Cultivo en leche de tornasol | : sin cambio |
| | 9) Hidrólisis de almidón | : + |
| 30 | 10) Formación de dióxido de carbono (glucosa) | : - |

1	11) Ensayo del rojo de metilo	: -
	12) Ensayo Voges-Proskauer (formación de acetilmetilcarbinol)	: -
5	13) Utilización de ácido cítrico	: -
	14) Catalasa	: +
	15) Oxidasa	: +
	16) Fenilalanina desaminasa	: -
	17) Ornitina descarboxilasa	: -
10	18) Lisina descarboxilasa	: -
	19) Formación de color fluorescente	: -
	20) Desnitrificación de nitrato	: -
15	21) Formación de polisacáridos:	forma grandes cantidades de polisacáridos viscosos a partir de diversos carbohidratos tales como glucosa, maltosa, dextrina, almidones hidrolizados, diversos materiales de partida almidonosos, sacarosa, etc.
20	22) Resistencia a la salinidad:	
25	Medio de cultivo de caldo de glucosa sin NaCl:	crecimiento ligero
	Medio de cultivo con 1-3% de NaCl añadido:	buen crecimiento
30	Medio de cultivo con 5% de NaCl añadido:	ningún crecimiento

1

23) Condiciones de crecimiento:

Temperatura: 15-40°C intervalo

de crecimiento 25-

-35°C óptimo

5

45°C no hay creci-

miento

propicio en

aerobio

pH: 6-8 intervalo de cre

cimiento

6,5-7,5 óptimo

10

24) Utilización de azúcar

Descomposición

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Oxidación</u>		<u>Fermentación</u>		<u>Materia- lización</u>
	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	
Glicerina	-	-	-	-	-
Xilosa	Diminuta	-	-	-	+
15 Sacarosa	Diminuta	-	-	-	+
Glucosa	Diminuta	-	-	-	+
Lactosa	Diminuta	-	-	-	+
Almidón	Diminuta	-	-	-	+
Fructosa	-	-	-	-	+
20 Galactosa	Diminuta	-	-	-	+
Manosa	-	-	-	-	+
Arabinosa	Diminuta	-	-	-	+
Maltosa	Diminuta	-	-	-	+
Manita	-	-	-	-	-
25 Sorbita	-	-	-	-	-

Las características anteriores han sido considera-
ras en base a "Laboratory Methods in Microbiology" (Métodos de laboratorio en microbiología), por W.F. Harrigan y otros, y al "Manual of Microbiological Method" (Manual de métodos en microbiología), American Microbiological Society.

30

270378

1 Tras búsqueda de bacterias que tuviesen estas caracterís-
ticas, en el "Bergey's Manual of Determinative Bacterio-
logy" (Manual Bergey de bacteriología determinativa), 7ª
ed. (1957), 8ª ed. (1974), se identificó, en base a la in-
5 formación relacionada a continuación, que esta bacteria es
Bacillus lentus y D-228 sellama "Bacillus lentus D-228".

1. Forma endosporas.
2. Las esporas son ovaladas, situadas centralmente
o hacia adelante en células cultivadas.
- 10 3. Los esporangios no están perceptiblemente disten-
didos.
4. Gram positiva.
5. Hidroliza al almidón, pero no se observa reduc-
ción de caseína ni licuación de gelatina.
- 15 6. Forma ureasa.
7. No crece en medio de cultivo de caldo con adición
de 5% de NaCl.
8. No crece a 45°C.

Esta bacteria está registrada en el Fermentation
20 Research Institute (Instituto de investigaciones sobre fer-
mentación), Agency of Industrial Science and Technology
(Agencia de ciencia y tecnología industriales), recibo de
solicitud nº 3337.

25 No hay informes en el sentido de que esta bacte-
ria produce sacáridos viscosos, y en particular sobre el
hecho de que, en un medio de cultivo relativamente simple,
con almidón como material de partida, esta bacteria amasa
grandes cantidades de polisacáridos de gran viscosidad, su-
periores en resistencia a ácido y calor, es decir, conoci-
30 mientos enteramente nuevos.

1 La presente invención se ha conseguido en base al
anterior conocimiento, y es un método para manufacturar
polisacáridos ácidos de gran viscosidad, caracterizado por-
que se recogen de cultivos de *Bacillus lentus*, que es ca-
5 paz de producir polisacáridos ácidos de gran viscosidad
cuando se cultiva en un medio de cultivo, polisacáridos
ácidos superiores en resistencia a ácidos, álcalis y calor,
en los que los principales constituyentes son glucosa, ga-
lactosa, manosa y ácido glucurónico.

10 Las bacterias que se pueden usar en la presente
invención no estén limitadas al *Bacillus lentus* D-228; se
puede utilizar cualquier microbio perteneciente al género
Bacillus, que sea capaz de producir el polisacárido busca-
do.

15 Como fuente de carbono usada en el medio de culti-
vo de la presente invención, son materiales de partida efi-
caces la glucosa, sacarosa, maltosa, sacáridos de almidón,
y todo tipo de almidón, y la dextrina da rendimiento espe-
cialmente bueno. Como fuente de nitrógeno, el líquido de
20 maceración de maíz, extracto de peptona y levadura, Profro
(proteína de semilla de algodón, nombre comercial, Traders
Oil, EE.UU.)/extracto de jugo de carne, etc, son muy efica-
ces para producción de polisacárido de gran viscosidad, y
el tipo y la densidad se pueden variar según la fuente de
25 carbono usada. Son sales inorgánicas eficaces los fosfatos,
sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, etc,
que refuerzan la producción de polisacárido y la viscosi-
dad.

30 Las condiciones propicias para el cultivo de esta
bacteria son una temperatura de 20-40°C, preferiblemente

1 23-30°C, un pH inicial del medio de cultivo de 5-8, prefe-
riblemente 7-7,5, con cultivo con sacudidas o cultivo con
agitación por corrientes. Tras 24 horas se observa un fenó-
meno de formación de espuma en el líquido de cultivo, y a
5 medida que avanza el periodo de cultivo empieza la produc-
ción de polisacáridos. Tras 60-90 horas gelifica el líqui-
do de cultivo, alcanzando un valor máximo de la viscosidad.
El pH del líquido de cultivo cae a medida que avanza el cul-
tivo, hasta que finalmente, a 5,2-5,4, el cultivo se inte-
10 rrumpe, dando polisacárido de máxima viscosidad con las ca-
racterísticas más superiores. Además, la cantidad de orga-
nismos es mucho menor que con otras bacterias productoras
de polisacárido. El aislamiento de los polisacáridos en el
líquido de cultivo se puede conseguir por métodos conoci-
15 dos. Por ejemplo, tras diluir el líquido con una cantidad
adecuada de agua, los organismos y la materia insoluble
se separan por centrifuga, y tras añadir 1-2% de cloruro
potásico a lo que sobrenada, los polisacáridos se precipi-
tan añadiendo metanol, etanol o acetona como agente de pre-
20 cipitación, se lavan y se deshidratan con acetona, y se se-
can bajo vacío, dando una composición fibrosa. El rendimien-
to es 85-95% del material de partida de sacárido.

El polisacárido viscoso crudo obtenido por este
método se vuelve a disolver, se trata térmicamente, se so-
25 mete a separación en centrifuga para eliminar la pequeña
cantidad de organismos y materia insoluble, se vuelve a
precipitar repetidamente con acetona o similar, para dar
polisacáridos viscosos refinados de gran pureza, blancos,
tipo hebra. Además, por precipitación con hidróxido de ce-
30 tiltrimetilamonio (tratamiento CTA), diálisis, y uso de re-

1 sinas intercambiadoras de iones, etc, se puede obtener un
producto super-refinado de gran pureza.

Las propiedades del polisacárido ácido obtenido
por este método son:

- 5 1. Punto de fusión: Generalmente los polisacáridos no tie-
nen punto de fusión; el punto de descomposición
es 210-218°C.
- 10 2. Viscosidad: Disuélvase en agua para preparar un líquido
pegajoso. En solución acuosa al 1% su viscosidad
es 4.000-5.000 cp (25°C). La Figura 1 da una com-
paración de la viscosidad de este sacárido y la
de goma de xantano y polisacáridos naturales.
- 15 3. Solubilidad en disolvente orgánico: Insoluble en disol-
ventes normales de precipitación de polisacárido,
tales como metanol, etanol, acetona, etc.
- 20 4. Reacción con hidróxido de cetiltrimetilamonio: Forma
precipitado blanco. Por tanto, son polisacáridos
ácidos.
- 25 5. Estabilidad en ácido y álcali: Muestra una viscosidad
relativamente estable en el intervalo de pH 3-11.
6. Estabilidad en sales: Muestra gran viscosidad en presen-
cia de sales metálicas bivalentes tales como sales
de calcio y magnesio, y también en agua de mar.
7. Espectro de absorción infrarroja: Como se muestra en la
Figura 2, a longitudes de onda de 5,8 y 6,25 μ hay
absorción debida a la presencia de éster y radical
ácido.
8. Color y forma: El producto refinado es blanco, tipo he-
bra.
- 30 9. Sacáridos constituyentes: El análisis por cromatografía

1 de gases mostró que los constituyentes principales eran glucosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico.

5 Los sacáridos constituyentes usualmente conocidos de polisacáridos ácidos producidos por microorganismos tipo Bacillus son los derivados de ramnosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico, los derivados de glucosa y ácido urónico, los derivados de glucosa, manosa y ácido urónico, los de fucosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico, los de glucosa, manosa, xilosa y ácido urónico, pero los sacáridos de glucosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico, 10 constituyentes de los polisacáridos ácidos obtenidos en la presente invención, no eran conocidos hasta ahora. Además, como muestra claramente la Fig. 1, en solución acuosa al 1% este polisacárido ácido tiene una viscosidad aún mayor que 15 la goma de xantano (polisacárido ácido producido por el microorganismo xanthomonas), que tiene la mayor viscosidad entre los polisacáridos ácidos producidos por microorganismos. La Figura 1 también da las viscosidades de los polisacáridos naturales goma "guar" y goma "karaya". 20

Los hechos anteriores confirman que los polisacáridos ácidos obtenidos según la presente invención difieren de los polisacáridos usuales conocidos. Los polisacáridos ácidos obtenidos según la invención han sido denominados D-228 (nombre provisional). 25

Debido a su gran viscosidad, los polisacáridos obtenidos según la presente invención se pueden usar como agentes de refuerzo de viscosidad para alimentos, y en la recuperación de petróleo de pozos de petróleo. También pueden hallar uso como vehículos para medicinas externas, apres 30

1 tos para textiles, aditivos para artículos de aseo, etc.

Ejemplo 1

5 Composición del medio de cultivo para cultivo in-
clinado: glucosa 0,5%, peptona 1%, extracto de jugo de car-
ne 1%, cloruro sódico 0,5%, agar agar 1,5%, pH 7,4.

Composición del medio de cultivo para cultivo pre-
vio: glucosa 0,5%, peptona 0,5%, extracto de levadura 0,2%,
extracto de jugo de carne 0,1%, pH 7,4.

10 Composición del medio de cultivo para cultivo prin-
cipal (producción): almidón de maíz 3%, líquido de macera-
ción de maíz 0,5%, peptona (o extracto de levadura) 0,1%,
 K_2HPO_4 0,05%, pH 8,0.

15 Los medios de cultivo en plano inclinado y para
cultivo previo se esterilizaron con vapor de agua durante
15 minutos a 110°C, y el medio de producción durante 15-30
minutos a 120°C. Tras cultivar Bacillus lentus en el medio
de cultivo plano inclinado durante 48 horas a 28°C, se ino-
cularon con un bucle del Bacillus lentus 50 ml de medio de
cultivo para cultivo previo, en un matraz de 500 ml con
20 ensanchamiento, y el cultivo con sacudidas se efectuó du-
rante 12-14 horas a 28°C. 1-5 ml de este líquido de culti-
vo previo se ponen en contacto con 50 ml de medio de cul-
tivo de producción, en un matraz de 500 ml con ensancha-
miento, y el cultivo con sacudidas se efectúa durante 72
25 horas a 25-28°C, con 200 rpm. Tras 15-20 horas de cultivo
tiene lugar el fenómeno de formación de espuma; después
empieza la producción de polisacárido, la viscosidad del
líquido de cultivo aumenta a medida que avanza el cultivo,
hasta que tras 60-72 horas gelifica y su viscosidad alcanza
30 un valor máximo. Además, a medida que la viscosidad aumenta

1 se ve una acumulación en aumento de polisacárido, y el pH del líquido de cultivo cae desde 7,3 a 5,5-5,3.

5 Cuando se acaba el cultivo se recoge 1 l de líquido de cultivo con máxima viscosidad, se diluye con una cantidad adecuada de agua, se separa por centrifugación a 10.000 rpm, y se eliminan las bacterias. Sin embargo, como la cantidad de bacterias originales era muy pequeña, no hay necesidad de usar centrífuga para obtener los constituyentes para polisacárido. Por tanto, se diluye el líquido de cultivo con una cantidad adecuada de agua, y tras añadir 1% de cloruro potásico se añadió, con agitación, una cantidad igual de acetona para efectuar la precipitación de polisacárido fibroso, se deshidrató con acetona anhidra y se secó bajo vacío. El rendimiento obtenido de composición fibrosa blanca fué 26 g (87%). Para refinar se añadió el agua suficiente para disolver 10 g de esta composición, se trató térmicamente durante 5 minutos a 90°C, y se centrifugó tras enfriar, para eliminar totalmente bacterias residuales y materia insoluble. A esto que sobrenadaba se añadió solución CTA, con agitación, y se precipitaron polisacáridos ácidos.

10

15

20

Tras eliminar el CTA se volvió a disolver el polisacárido en agua y se volvió a precipitar con acetona. El precipitado se lavó y deshidrató con acetona, y se secó bajo vacío, obteniendo 8,5 g de producto refinado blanco puro, tipo hebras.

25

Ejemplo 2

Preparación del medio de cultivo para preparación.

1. Jarabe que contiene maltosa 5% (peso seco), peptona 8%, líquido de maceración de maíz 0,15%, K_2HPO_4 0,15%, $MgSO_4$

30

- 1 7H₂O 0,015%, FeCl₃/6H₂O 0,008%, CaCl₂ 0,008%, pH 8,0
(110°C 20 min de esterilización con vapor de agua).
2. Jarabe que contiene maltosa 3% (peso seco), "Profro"
0,3%, líquido de maceración de maíz 0,2%, K₂HPO₄ 0,1%,
5 MgSO₄/7H₂O 0,01%, FeCl₃/6H₂O 0,005%, CaCl₂ 0,005%, pH
8,0 (110°C, 20 min de esterilización con vapor de agua).
3. Glucosa 3%, peptona 0,5%, líquido de maceración de maíz
0,1%, K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄/7H₂O 0,01%, FeCl₃/6H₂O 0,005%,
CaCl₂ 0,005%, pH 8,0 (110°C, 20 min esterilización con
10 vapor de agua).
4. Dextrina (DE 30) 3%, líquido de maceración de maíz 0,5%,
extracto de levadura 0,1%, K₂HPO₄ 0,05%, pH 8,0 (120°C,
15 min esterilización con vapor de agua).
5. Almidón de maíz 5%, líquido de maceración de maíz 0,83%,
15 extracto de levadura 0,165%, K₂HPO₄ 0,083%, pH 8,0 (120
°C, 30 min esterilización con vapor de agua).
6. Almidón de maíz 2%, líquido de maceración de maíz 0,6%,
pH 8,0 (120°C, 30 min esterilización con vapor de agua).

20 Efectuando un cultivo de 70-80 horas como en el
Ejemplo 1, usando el medio de cultivo de producción 1-5 del
anterior Ejemplo. 2, se recogieron polisacáridos del material
cultivado, tipo jalea, de la misma manera que en el Ejemplo
1. Los polisacáridos obtenidos con los medios de cultivo en
este ejemplo eran aproximadamente parejos a los obtenidos
25 en el Ejemplo 1. Los rendimientos y las cantidades recogi-
das se dan en la tabla siguiente:

30

270378

	Medio de cultivo de producción	Rendimiento (%)	Cantidad reco-gida (gramos)	Tiempo de cultivo (horas)
1	1	50	25	80
	2	50	15	72
5	3	43	12,9	72
	4	56	16,8	72
	5	87	43,6	80
	6	97	19,4	60

10 4. Breve explicación de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre la concentración y la viscosidad para la solución acuosa de polisacárido D-228 obtenido por el método según la presente invención.

15 La Figura 2 es el espectro de absorción infrarroja del polisacárido D-228 obtenido por el método según la presente invención.

Leyenda de las figuras

20 Fig. 1 - Relación entre concentración y viscosidad en solución acuosa de polisacárido.

Clave: 1. polisacárido D-228

2. Guar

3. Xantano

4. Karaya

25 5. Viscosidad (cp)

6. Concentración (%)

Fig. 2 - Espectro de absorción infrarroja para el polisacárido D-228

Clave: 1. Longitud de onda

2. Transmitancia (%)

3. Número de onda (cm^{-1})

30

270378

1

REIVINDICACIONES

5

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método de fabricar polisacáridos ácidos de alta viscosidad, el cual método comprende cultivar un microorganismo del tipo *Bacillus lentus*, en un medio de cultivo que contiene uno o más carbohidratos como fuente de carbono, y aislar polisacáridos en los que los constituyentes principales son glucosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico.

15

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, donde el microorganismo es *Bacillus lentus* D-228, según se ha definido en la memoria.

20

3ª.- Método según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, donde el medio de cultivo contiene como fuente de carbono glucosa, sacarosa, maltosa, sacáridos de almidón, almidón, dextrina, o mezclas de ellos.

25

4ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, donde el medio de cultivo contiene adicionalmente una fuente de nitrógeno elegida entre líquido de maceración de maíz, peptona, extracto de levadura, extracto de jugo de carne, o una mezcla de ellos.

30

5ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, donde el medio de cultivo contiene adicio-

270378

1 nalmente una o más sales inorgánicas elegidas entre un
fosfato o una sal de magnesio, calcio o hierro de un áci-
do mineral.

5 6ª.- Método según cualquiera de las reivindica-
ciones 1ª a 5ª, donde el microorganismo se cultiva a 20°C
a 40°C.

7ª.- Método según cualquiera de las reivindica-
ciones 1ª a 6ª, donde el pH inicial del medio de cultivo
es 5 a 8.

10 8ª.- Método según cualquiera de las reivindica-
ciones 1ª a 7ª, donde el polisacárido resultante tiene una
viscosidad de 4000-5000 cp, medida en solución acuosa al
1% a 25°C.

15 9ª.- Un método de fabricar polisacáridos ácidos
de alta viscosidad.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede, representado en los dibujos que se acompaña y con
los fines que se han especificado.

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

Madrid, 07.ABR.1978

P.A.

25 **Alberto de Elizaburu**
Por Poder,



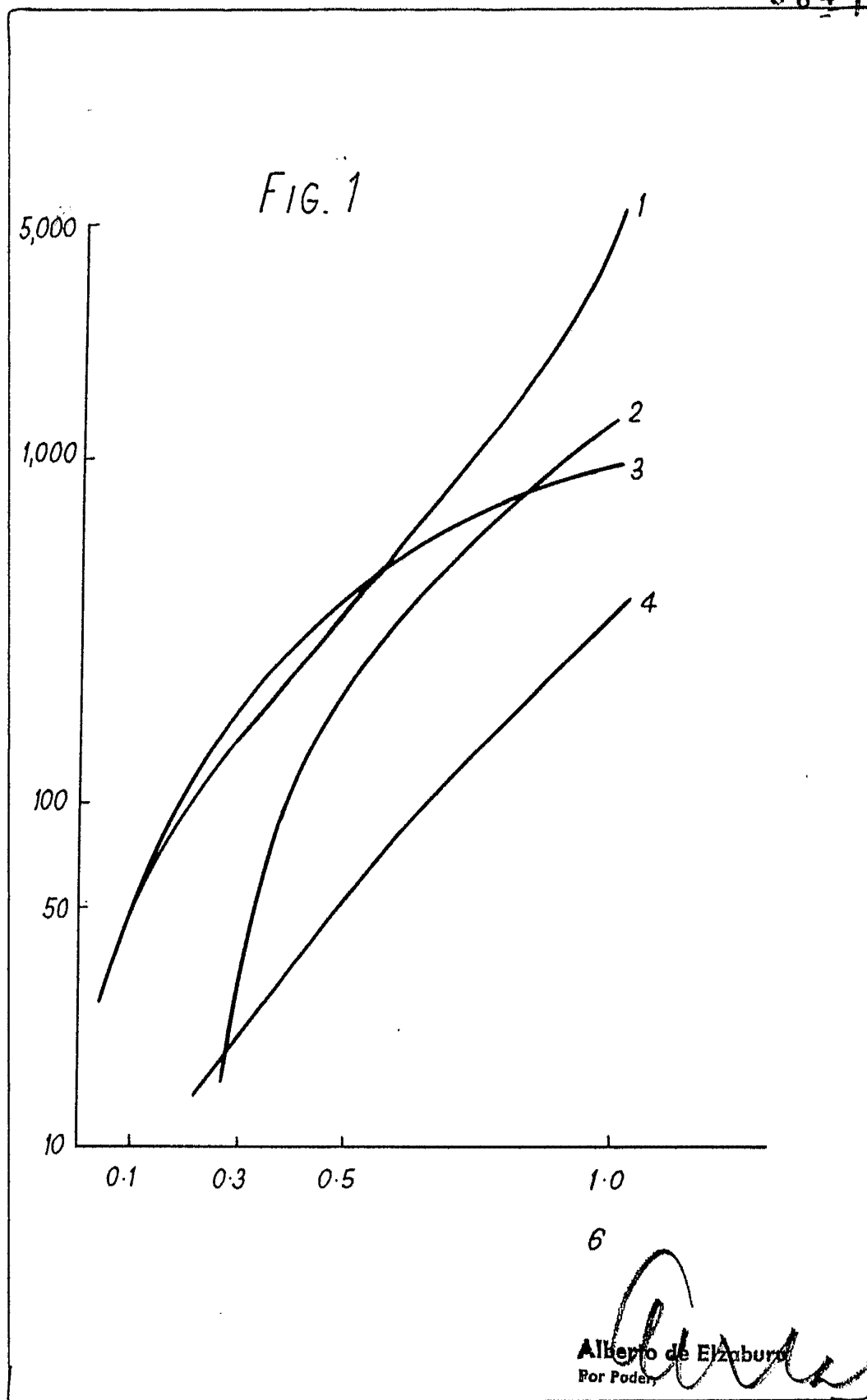
30

30

270378

VAL





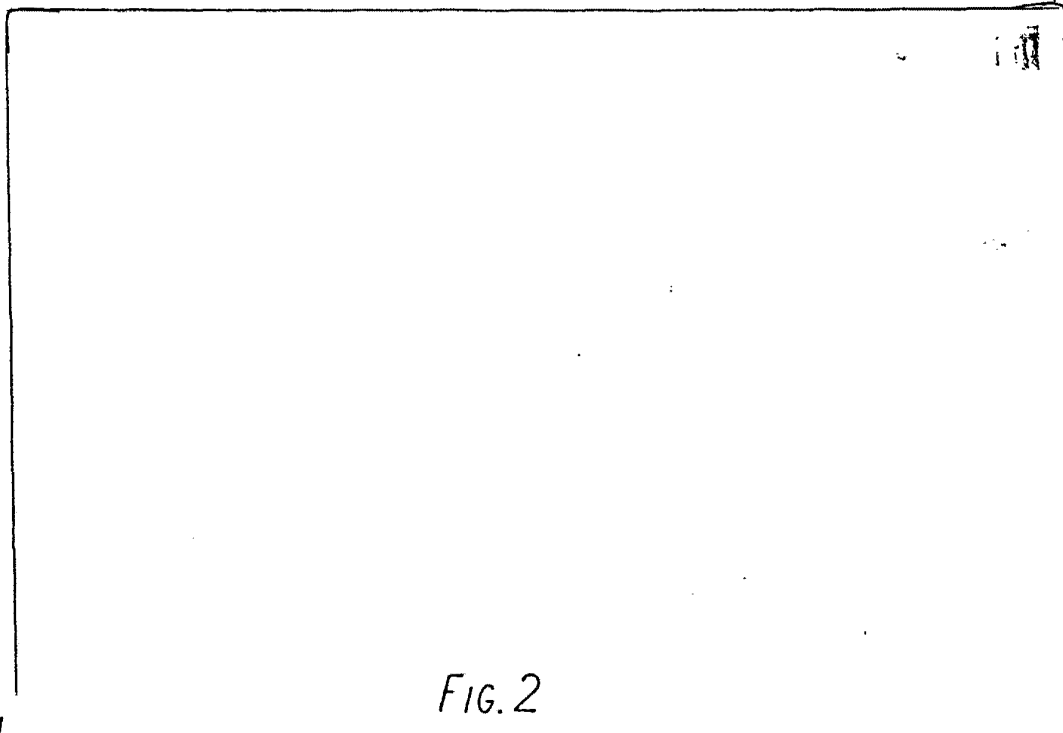
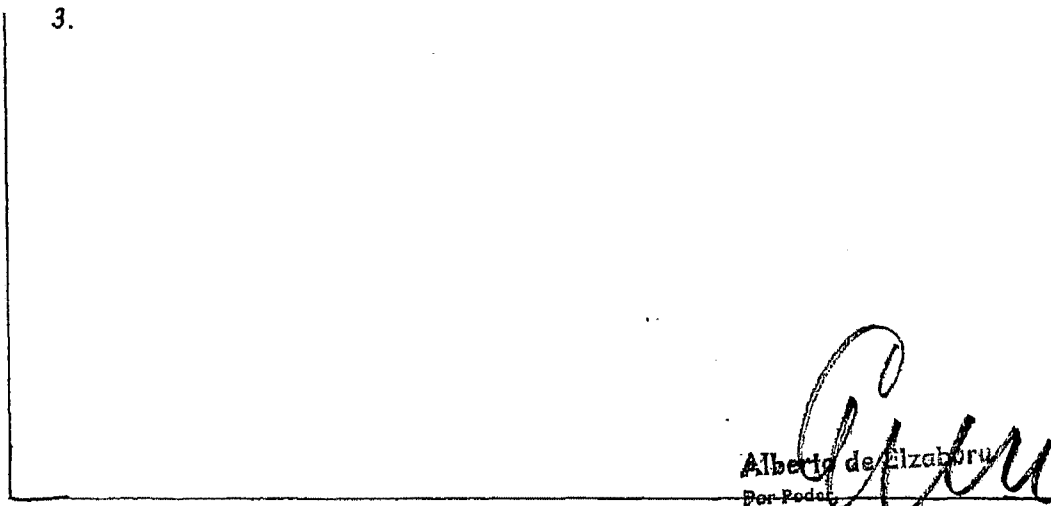
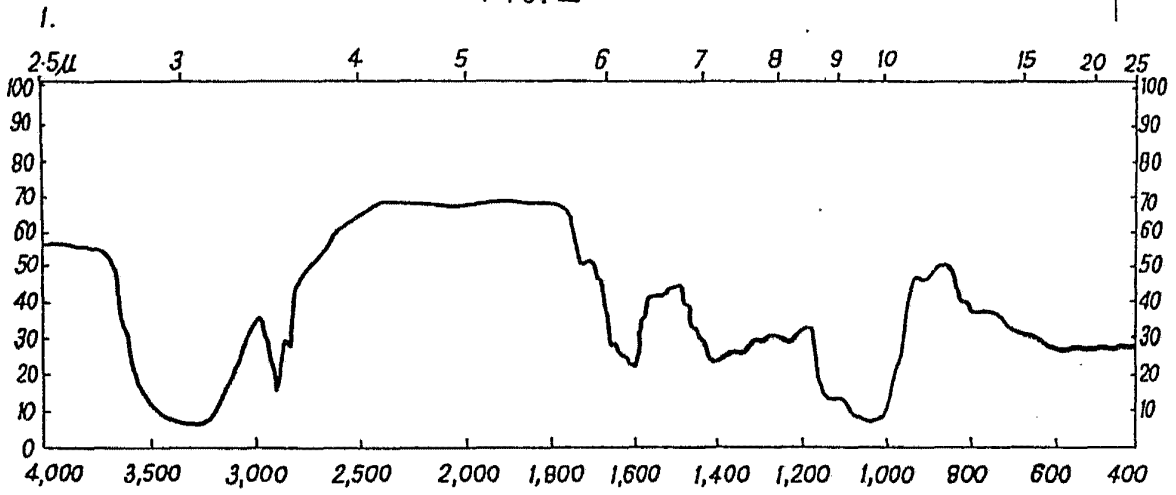


FIG. 2



Alberto de Elizaburu
Por Poder