



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 072**

51 Int. Cl.:
C11D 3/386 (2006.01)
C11D 3/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **01270590 .1**
86 Fecha de presentación : **14.11.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1341893**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2003**

54 Título: **Composiciones detergentes enzimáticas.**

30 Prioridad: **14.12.2000 EP 00204514**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **UNILEVER N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Hage, Ronald;**
Klugkist, Jan;
Swarthoff, Ton y
Van der Waal, P.

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones detergentes enzimáticas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente al campo de las composiciones de limpieza y detergentes enzimáticas. Más, en particular la invención se refiere a composiciones detergentes enzimáticas que comprenden enzimas que tienen actividad lipolítica.

10

Antecedentes y técnica anterior

Se conocen diversos tipos de enzimas como aditivos para composiciones detergentes. Por ejemplo, se han descrito composiciones detergentes que contienen proteasas, celulasas, amilasas, lipasas y diversas combinaciones de las mismas en la bibliografía y han aparecido varios productos de este tipo en el mercado. La presente invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden enzimas lipolíticas o lipasas. Tales enzimas contribuirían a la eliminación de suciedad grasa de tejidos hidrolizando uno o más de los enlaces éster en triglicéridos.

15

El documento US-A-6.103.685 (Procter & Gamble) da a conocer composiciones detergentes que comprenden al menos un tensioactivo aniónico, una lipasa y un catalizador de Mn que tiene un ligando N-donador polidentado, $Mn^{IV}_2(m-O)_3(1,4,7\text{-trimetil-1,4,7-triazaciclono-nano})_2(PF_6)_2$.

20

El documento EP-A-214761 (Novo Nordisk) da a conocer lipasas que se derivan de microorganismos de la especie *Pseudomonas cepacia*, y el documento EP-A-258068 (Novo Nordisk) describe lipasas que se derivan de microorganismos del género *Humicola*. Ambas solicitudes de patente también describen el uso de estas lipasas como aditivos detergentes.

25

Se proporcionan agentes adicionales de composiciones detergentes que comprenden lipasa por los documentos EP-A-205208 y EP-A-206390 (ambas de Unilever), que dan a conocer una clase de lipasas definidas basándose en sus relaciones inmunológicas, y describen su uso en composiciones detergentes y lavado de materiales textiles. Las lipasas preferidas son las de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gladioli* y las especies de *Chromobacter*.

30

El documento EP-A-331376 (Amano) describe lipasas, su uso y su producción por medio de técnicas de ADN recombinante (ADNr), e incluye una secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Se facilitan ejemplos adicionales de enzimas lipasas producidas por medio de técnicas de ADNr en los documentos WO-A-89/09263 y EP-A-218272 (ambos de Gist-Brocades).

35

A pesar del gran número de publicaciones sobre las enzimas lipasas y sus modificaciones, sólo la lipasa derivada de *Humicola lanuginosa* y producida en *Aspergillus oryzae* como huésped ha encontrado hasta la fecha una amplia aplicación como aditivo para productos de lavado de tejidos. Está disponible de Novo Nordisk con el nombre comercial de Lipolase®.

40

En su artículo en Chemistry and Industry 1990, páginas 183-186, Henrik Malmos indica que se sabe que generalmente la actividad de las lipasas durante el proceso de lavado es baja, y Lipolase® no es una excepción. Durante el proceso de secado, cuando se reduce el contenido en agua del tejido, la enzima recupera su actividad y se hidrolizan las manchas de grasa. Durante el ciclo de lavado siguiente, se elimina el material hidrolizado. Esto también explica por qué el efecto de las lipasas es bajo tras el primer ciclo de lavado, pero significativo en los ciclos siguientes. Estos hallazgos también se describen por Aaslyng *et al.* (1991), en "Mechanistic Studies of Proteases and Lipases for the Detergent Industry", J. Chem. Tech. Biotechnol. 50, 321-330.

50

Los inventores de la presente solicitud consideran una desventaja de los productos detergentes que contienen lipasa existentes que no pueda esperarse un beneficio de limpieza significativo por la presencia de la enzima lipolítica cuando se usan los productos para lavar tejidos que no han estado en contacto con el producto detergente antes.

55

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición detergente enzimática que muestra una actividad de limpieza superior sobre manchas de aceite, y que, en consecuencia, mostrará actividad lipolítica cuando se use para lavar tejidos que no han estado en contacto con el producto detergente antes. También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición detergente enzimática que es especialmente adecuada para su uso en combinación con una secadora de tambor.

60

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que ciertas enzimas lipolíticas o lipasas pueden interaccionar de manera sinérgica con ciertos catalizadores de blanqueo de metal de transición para proporcionar un rendimiento de limpieza superior a las composiciones detergentes que los contienen.

65

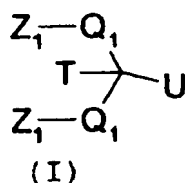
Definición de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición detergente enzimática que comprende:

(a) un tensioactivo,

(b) 10 - 20.000 UL por gramo de la composición detergente de una enzima lipolítica que puede obtenerse a partir de *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Rhizomucor miehei*, y

(c) un ligando N-donador polidentado sin puentes cruzados que puede formar un complejo con un metal de transición, en el que dicho complejo puede catalizar el blanqueo de manchas en tejidos por medio del oxígeno atmosférico, en el que el ligando está definido por la fórmula general (I) o un complejo de metal de transición del mismo, preferiblemente de hierro, manganeso, cobre o cobalto,



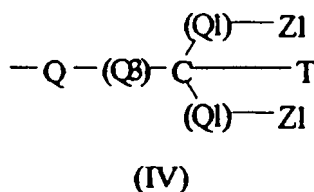
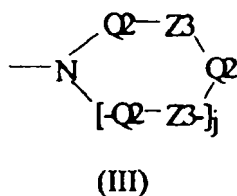
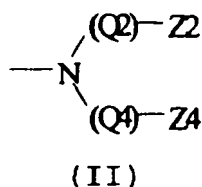
en la que:

los grupos Z_1 representan independientemente un grupo coordinante seleccionado de un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido que se selecciona de piridina, pirimidina, pirazina, pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoquinolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tiazol;

Q_1 es $[CR_1R_2]_n$ con R_1 y R_2 seleccionados cada uno independientemente de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -R y -OR, en los que R representa alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado de carbonilo con $n = 0, 1$ ó 2 ;

T representa un grupo no coordinado seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -R y -OR, en los que R representa alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado de carbonilo, estando R opcionalmente sustituido por uno o más grupos funcionales E;

U representa un grupo coordinante de la fórmula general (II), (III) o (IV):



en las que:

$Q2$ y $Q4$ se definen independientemente como para Q_1 ; y

cada Q3 representa un enlace covalente o un alquileo C₁-C₄, preferiblemente un enlace covalente

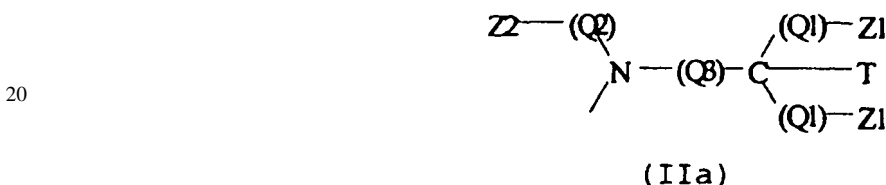
Q representa -N(T)- (en el que T se define independientemente como antes), o un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido o un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido seleccionado de piridina, pirimidina, pirazina, 5 pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoquinolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tiazol;

Z_2 se define independientemente como para Z_1 ;

los grupos Z_3 representan independientemente $-N(T)-$ (en el que T se define independientemente como antes);

Z4 representa un grupo coordinante o no coordinante seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -NH-C(NH)NH₂, -R y -OR, en los que R= alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado de carbonilo, estando R opcionalmente sustituido, o

15 Z_4 representa un grupo de la fórmula general (IIa):



25 y

$1 \leq j < 4.$

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la limpieza de tejidos usando la 30 composición de la invención.

Descripción de la invención

(a) *El tensioactivo*

Un primer elemento de las composiciones detergentes enzimáticas de la presente invención es el tensioactivo. Las composiciones de la invención contendrán uno o más compuestos activos como detergente (tensioactivos) que pueden elegirse de compuestos activos como detergente jabonosos y no jabonosos, aniónicos, catiónicos, no iónicos, anfóteros y zwitteriónicos, y mezclas de los mismos. Están disponibles muchos compuestos activos como detergente adecuados y se describen en detalle en la bibliografía, por ejemplo, en “Surface-Active Agents and Detergents”, Volúmenes I y II, por Schwartz, Perry y Berch.

Los compuestos activos como detergente preferidos que pueden usarse son los jabones y compuestos no iónicos y aniónicos, no jabonosos sintéticos. Se conocen bien los tensioactivos aniónicos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen alquilbencenosulfonatos, particularmente alquilbencenosulfonatos lineales que tienen una longitud de la cadena de alquilo de C₈-C₁₅; alquilsulfatos primarios y secundarios, particularmente alquilsulfatos primarios C₈-C₁₅; alquiletersulfatos; olefinasulfonatos; alquixilenosulfonatos; dialquilsulfosuccinatos y sulfonatos de éster de ácido graso. Se prefieren generalmente las sales sódicas.

Los tensioactivos no iónicos que pueden utilizarse incluyen los etoxilatos de alcohol primario y secundario, especialmente los alcoholes alifáticos C₈-C₂₀ etoxilados con un promedio de desde 1 hasta 20 moles de óxido de etileno por mol de alcohol, y más especialmente los alcoholes alifáticos primarios y secundarios C₁₀-C₁₅ etoxilados con un promedio de desde 1 hasta 10 (y preferiblemente de 3 a 7) moles de óxido de etileno por mol de alcohol. Los tensioactivos no iónicos no etoxilados incluyen alquilpoliglucósidos, monoéteres de glicerol y polihidroxiamidas (glucamida). Si la composición detergente comprende tanto tensioactivos no iónicos como aniónicos, se prefiere que la razón de tensioactivo no iónico con respecto a tensioactivo aniónico sea de al menos 1 a 3, más preferiblemente de al menos 1 a 1.

La elección del compuesto activo como detergente (tensioactivo), y la cantidad presente, dependerá del uso pretendido de la composición detergente. En las composiciones para el lavado de tejidos, pueden elegirse diferentes sistemas de tensioactivos, tal como sabe bien el formulador experto, para productos para el lavado a mano y para productos destinados para su uso en diferentes tipos de lavadora.

La cantidad total de tensioactivo presente también dependerá del uso final pretendido y puede ser de hasta el 60% en peso, por ejemplo, en una composición para el lavado de tejidos a mano. En composiciones para el lavado a máquina de tejidos, generalmente es apropiada una cantidad de desde el 5 hasta el 40% en peso. Las composiciones detergentes adecuadas para su uso en la mayor parte de las lavadoras automáticas de tejidos generalmente contienen tensioactivo

aniónico no jabonoso, o tensioactivo no iónico, o combinaciones de los dos en cualquier razón, opcionalmente junto con jabón.

5 También son aplicables tensioactivos tales como los descritos en el documento EP-A-328177 (Unilever), que muestran resistencia a la precipitación con sales (*salting-out*), los tensioactivos de alquilpoliglucósido descritos en el documento EP-A-070074, y alquilmonoglucósidos.

10 Los sistemas de tensioactivos preferidos son mezclas de materiales activos como detergente aniónicos y no iónicos, en particular los grupos y ejemplos de tensioactivos aniónicos y no iónicos señalados en el documento EP-A-346995 (Unilever). Se prefiere especialmente un sistema de tensioactivos que es una mezcla de una sal de metal alcalino de un sulfato de alcohol primario C₁₆-C₁₈ junto con un etoxilato con 3-7 OE de un alcohol primario C₁₂-C₁₅.

15 El detergente no iónico está presente preferiblemente en cantidades superiores al 10%, por ejemplo del 25-90% en peso del sistema de tensioactivos. Los tensioactivos aniónicos pueden estar presentes, por ejemplo, en cantidades en el intervalo desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 40% en peso del sistema de tensioactivos.

(b) La enzima lipolítica

20 Como segundo constituyente, las composiciones detergentes enzimáticas de la invención comprenden 10 - 20.000 UL por gramo de la composición detergente de una enzima lipolítica según la reivindicación 1, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en Lipolase, Lipolase ultra, LipoPrime, Lipomax, Liposam, y lipasa de *Rhizomucor miehei* (por ejemplo tal como se describe en el documento EP-A-238023 (Novo Nordisk).

25 Las composiciones detergentes enzimáticas de la invención comprenden además 10 - 20.000 UL por gramo, y preferiblemente 50 - 2.000 UL por gramo de la composición detergente, de una enzima lipolítica. En esta memoria descriptiva, las UL o unidades de lipasa se definen tal como lo están en el documento EP-A-258068 (Novo Nordisk).

30 Un método adicional para evaluar la actividad enzimática es midiendo la reflectancia a 460 nm según técnicas convencionales.

Pueden hallarse enzimas adecuadas para las composiciones de la invención en las clases enzimáticas de las esterasas y lipasas, (EC 3.1.1.*, en la que el asterisco indica cualquier número).

35 Un rasgo característico de las de lipasas es que muestran actividad interfacial. Esto significa que la actividad enzimática es muy superior en un sustrato que tiene interfases o micelas formadas, que en un sustrato totalmente disuelto. La activación de la interfase se refleja en un aumento brusco en la actividad lipolítica cuando se eleva la concentración del sustrato por encima de la concentración micelar crítica (CMC) del sustrato, y se forman interfases. Experimentalmente, puede observarse este fenómeno como una discontinuidad en la gráfica de actividad enzimática frente a la concentración de sustrato. Sin embargo, al contrario que las lipasas, las cutinasas no muestran ninguna actividad interfacial sustancial.

45 Debido a este rasgo característico, es decir, la ausencia de activación interfacial, se definen las cutinasas, para los fines de esta solicitud de patente, como enzimas lipolíticas que no muestran sustancialmente activación interfacial. Por lo tanto, las cutinasas difieren de las lipasas clásicas en que no tienen una cubierta helicoidal que cubre el sitio de unión catalítico. Las cutinasas pertenecen a una subclase diferente de enzimas (EC 3.1.1.50) y se considera que están fuera del alcance de la presente invención.

50 Son de gran interés para la presente invención las lipasas fúngicas, tales como las de *Humicola lanuginosa* y *Rhizomucor miehei*. Particularmente adecuada para la presente invención es la lipasa de la cepa DSM 4109 de *Humicola lanuginosa*, que se describe en el documento EP-A-305216 (Novo Nordisk), y que está disponible comercialmente como Lipolase (TM). También son adecuadas las variantes de esta enzima, tal como se describe en los documentos WO-A-92/05249, WO-A-94/25577, WO-A-95/22615, WO-A-97/04079, WO-A-97/07202, WO-A-99/42566, WO-A-00/60063. Se prefiere especialmente la variante D96L que está disponible comercialmente de Novozymes como Lipolase ultra, y la variante que se vende por Novozymes con el nombre comercial de LipoPrime.

55 La enzima lipolítica de la presente invención puede añadirse de manera útil a la composición detergente en cualquier forma adecuada, es decir, la forma de una composición granular, una suspensión de la enzima o con material vehículo (por ejemplo como en el documento EP-A-258068 y los productos Savinase[®] y Lipolase[®] de Novozymes). Un buen modo de añadir la enzima a un producto detergente líquido es en la forma de una suspensión que contiene del 0,5 al 50% en peso de la enzima en un tensioactivo no iónico de alcohol etoxilado, tal como se describe en el documento EP-A-450702 (Unilever).

60 La enzima que va a usarse en las composiciones detergentes según la invención puede producirse clonando el gen para la enzima en un microorganismo de producción adecuado, tal como *Bacilli*, o *Pseudomonaceae*, levaduras, tales como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*, u hongos como *Aspergillus*. El microorganismo de producción preferido es *Aspergillus* con preferencia especial por *Aspergillus oryzae*.

(c) *El catalizador de blanqueo*

Como tercer componente, las composiciones detergentes enzimáticas de la invención comprenden un catalizador de blanqueo según la reivindicación 1, que es un complejo de un metal de transición y un ligando donador de nitrógeno polidentado excluyendo los ligandos macrocíclicos con puentes cruzados.

El catalizador de blanqueo *per se* puede seleccionarse de una amplia gama de moléculas orgánicas (ligandos) y complejos de las mismas. Se encuentran moléculas orgánicas (ligandos) y complejos adecuados para su uso con un agente de refuerzo de disolución de oxígeno, por ejemplo en: los documentos GB 9906474.3; GB 9907714.1; GB 98309168.7, GB 98309169.5; GB 9027415.0 y GB 9907713.3; DE-A-19755493; EP-A-999050; WO-A-9534628; EP-A-458379; EP-A-909809; US-A-4.728.455; WO-A-98/39098; WOA-98/39406, WO-A-9748787, WO-A-00/29537 y WO-A-00/52124. Los catalizadores preferidos son complejos de metal de transición del ligando MeN4Py (N,N-bis(piridin-2-il-metil)-1,1-bis(piridin-2-il)-1-aminoetano), N,N-bis(piridin-2-il-metil)-1,1-bis(piridin-2-il)-aminometano, 1,4-bis(quinolin-2-il-metil)-7-etil-1,4,7-triazaciclonoanano; 1H-1,4,8,11-benzotetraazaciclotridecin-2,5,7,10(6H, 11H)tetróna, 13,14-dicloro-6,6-dietil-3,4,8,9-tetrahidro-3,3,9,9-tetrametilo; N-metil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-bencil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-metil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-bencil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N,N,N',N'-tetrakis(3-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N,N,N',N'-tetrakis(piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-trimetilamoniopropil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N,N'-dimetil-N,N'-bis(piridin-2-il-metil)-ciclohexano-1,2-diamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(5-etil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-etil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N,N,N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-N'(2'-metoxi-etil-1)-etilendiamina; N,N,N'-tris(1-metil-bencimidazol-2-il)-N'-metil-etilendiamina; N-(furan-2-il)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-(2-metoxietil)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-metil-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-etil-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-bencil-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-(2-metoxietil)-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-metil-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-etil-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-bencil-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-(2-metoxietil)-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-etil-N,N',N'-tris(5-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; N-bencil-N,N',N'-tris(5-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina; y N-(2-metoxietil)-N,N',N'-tris(5-etil-piridin-2-il-metil)etilen-1,2-diamina.

A continuación, se encuentra una lista no exhaustiva de ligandos con los que pueden formarse catalizadores de blanqueo por aire (complejos de metal de transición). Será evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversas variaciones o la sustitución de estos compuestos sin cambiar sustancialmente su actividad. Los catalizadores de blanqueo por aire pueden formarse previamente o formarse *in situ* durante un lavado acuoso, cuando el ligando forma rápidamente un complejo con iones de metales de transición traza disponibles en disolución acuosa. Los metales de transición preferidos son hierro y manganeso, y en particular hierro. No obstante, es una cuestión de la experimentación de rutina o de referirse a la bibliografía el determinar qué metal de transición proporciona la mayor utilidad o la preparación adecuada del mismo. En el caso de un complejo formado previamente, la selección del contraión Y para establecer la neutralidad de carga no es crítica para la actividad del complejo. Los ejemplos no limitantes de dichos contraiones son cloruro, sulfato, nitrato, metilsulfato, iones tensioactivos, tales como alquil sulfatos de cadena larga, alquil sulfonatos, alquil bencenosulfonatos, tosilato, trifluorometilsulfonato, perclorato, BPh4-, PF6-, y mezclas de los mismos.

La lista no exhaustiva es: tris(piridin-2-il-metil)amina; 1,4,7-tris(pirazol-1-il-metil)-1,4,7-triazaciclonoanano; 1,4-bis(quinolin-2-il-metil)-7-etil-1,4,7-triazaciclonoanano; 1,1-bis(piridin-2-il)-N-metil-N-(piridin-2-il-metil)metilamina; 1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(6-metil-piridin-2-il-metil)metilamina; 2,6-bis(piridin-2-il-metil)-1,1,7,7-tetrakis(piridin-2-il)-2,6-diazaheptano; 1,1-bis(piridin-2-il)-1-bencil-N,N-bis(piridin-2-il-metil)metilamina; 1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(5-metoxycarbonil-piridin-2-il-metil)metilamina; 1-(α , α -bis(piridin-2-il))metil-4,7-dimetil-1,4,7-triazaciclonoanano; 1-(α , α -bis(piridin-2-il))etil-4,7-dimetil-1,4,7-triazaciclonoanano; 2,2,4,4-tetrakis(piridin-2-il)-3-azapentano; 1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(bencimidazol-2-il-metil)metilamina; 2,6-bis(metoxi-bis(piridin-2-il-metil)piridina; 2,6-bis(hidroxi-bis(piridin-2-il)-metil)piridina; (N-metil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; (N-trimetilamoniopropil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; (N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N,N,N',N'-tetrakis(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilen-diamina; N,N'-dimetil-N,N'-bis(piridin-2-il-metil)-ciclohexano-1,2-diamina; N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(5-etil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(5-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-metil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N-bencil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; N,N,N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-N'(2'-metoxi-etil-1)-etilendiamina; N,N,N'-tris(1-metil-bencimidazol-2-il)-N'-metil-etilendiamina; N-(furan-2-il)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina; y N-(2-hidroxietil)-N,N',N'-tris(3-etil-piridin-2-il-metil)-etilendiamina.

(d) *Componentes opcionales*(d1) *Adyuvantes de detergencia*

Las composiciones de blanqueo enzimáticas de la invención generalmente contienen también uno o más adyuvantes de detergencia. Este adyuvante de detergencia puede ser cualquier material que puede reducir el nivel de iones calcio libres en el líquido de lavado y proporcionará preferiblemente a la composición otras propiedades beneficiosas, tales como la generación de un pH alcalino, la suspensión de la suciedad eliminada del tejido y la suspensión del material de arcilla de suavizado de los tejidos. La cantidad total de adyuvante de detergencia en las composiciones oscilará de manera adecuada desde el 5 hasta el 80%, preferiblemente desde el 10 hasta el 60% en peso. Los adyuvantes inorgánicos que pueden estar presentes incluyen carbonato de sodio, si se desea en combinación con una simiente de cristalización para el carbonato de calcio, tal como se describe en el documento GB-A-1.437.950 (Unilever); aluminosilicatos cristalinos y amorfos, por ejemplo, zeolitas tal como se describe en el documento GB-A-1.473.201 (Henkel), aluminosilicatos amorfos tal como se describe en el documento GB-A-1.473.202 (Henkel) y aluminosilicatos cristalinos/amorfos mixtos tal como se describe en el documento GB-A-1.470.250 (Procter & Gamble); y silicatos estratificados tal como se describe en el documento EP-B-164 (Hacksawed). También pueden estar presentes adyuvantes de fosfato inorgánico, por ejemplo, ortofosfato, pirofosfato y tripolifosfato de sodio, pero ya no se prefieren por motivos ambientales. Las composiciones detergentes de la invención contienen preferiblemente un adyuvante de aluminosilicato de metal alcalino, preferiblemente de sodio. Los aluminosilicatos de sodio pueden incorporarse generalmente en cantidades de desde el 10 hasta el 70% en peso (base anhidra), preferiblemente desde el 25 hasta el 50% en peso. El aluminosilicato de metal alcalino puede ser o bien cristalino o bien amorfo o mezclas de los mismos, que tienen la fórmula general: $0,8-1,5 \text{ Na}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 0,8-6 \text{ SiO}_2$

Estos materiales contienen cierta cantidad de agua unida y se necesita que tengan una capacidad de intercambio del ion calcio de al menos 50 mg de CaO/g. Los aluminosilicatos de sodio preferidos contienen 1,5 - 3,5 unidades de SiO_2 (en la fórmula anterior). Tanto los materiales amorfos como los cristalinos pueden prepararse fácilmente mediante la reacción entre silicato de sodio y aluminato de sodio, tal como se describe ampliamente en la bibliografía. Adyuvantes de detergencia de intercambio iónico de aluminosilicato de sodio cristalino adecuados se describen, por ejemplo, en el documento GB-A-1.429.143 (Procter & Gamble). Los aluminosilicatos de sodio preferidos de este tipo son las zeolitas A y X, bien conocidas y comercialmente disponibles, y mezclas de las mismas. La zeolita puede ser la zeolita 4A disponible comercialmente, utilizada ampliamente en la actualidad en los detergentes en polvo para lavado. Sin embargo, según una realización preferida de la invención, el adyuvante de zeolita incorporado en las composiciones de la invención es zeolita P con el aluminio máximo (zeolita MAP) tal como se describe y se reivindica en el documento EP-A-384070 (Unilever). La zeolita MAP se define como un aluminosilicato de metal alcalino del tipo de la zeolita P que tienen una razón de silicio con respecto a aluminio que no sobrepasa de 1,33, preferiblemente dentro del intervalo de desde 0,90 hasta 1,33 y más preferiblemente dentro del intervalo de desde 0,90 hasta 1,20. Especialmente preferida es la zeolita MAP que tiene una razón de silicio con respecto a aluminio que no sobrepasa de 1,07, más preferiblemente de aproximadamente 1,00. La capacidad de unión de calcio de la zeolita MAP es generalmente de al menos 150 mg de CaO por g de material anhidro.

Los adyuvantes orgánicos que pueden estar presentes incluyen polímeros de policarboxilato, tales como poliacrilatos, copolímeros de acrílico/maleico y fosfinatos acrílicos; policarboxilatos monoméricos tales como citratos, gluconatos, oxidisuccinatos, mono, di y trisuccinatos de glicerol, carboximetiloxisuccinatos, carboximetiloximalonatos, dipicolinatos, hidroxietiliminodiacetatos, alquil y alquenilmalonatos y succinatos; y sales de ácido graso sulfonado.

Los adyuvantes orgánicos especialmente preferidos son los citratos, utilizados adecuadamente en cantidades de desde el 5 hasta el 30% en peso, preferiblemente desde el 10 hasta el 25% en peso; y polímeros acrílicos, más especialmente copolímeros de acrílico/maleico, utilizados adecuadamente en cantidades de desde el 0,5 hasta el 15% en peso, preferiblemente desde el 1 hasta el 10% en peso. Los adyuvantes, tanto inorgánicos como orgánicos, están presentes preferiblemente en forma de su sal de metal alcalino, especialmente su sal sódica.

(d2) *Componentes de blanqueo*

Las composiciones detergentes según la invención también pueden contener adicionalmente un sistema de blanqueo. Las composiciones para el lavado de tejidos pueden contener de manera deseable compuestos de blanqueo de peróxido, por ejemplo, persales inorgánicas o peroxiácidos orgánicos, que pueden producir peróxido de hidrógeno en disolución acuosa.

Los compuestos de blanqueo de peróxido adecuados incluyen peróxidos orgánicos tales como el peróxido de urea y persales inorgánicas tales como los perboratos, percarbonatos, perfosfatos, persilicatos y persulfatos de metal alcalino. Las persales inorgánicas preferidas son el perborato de sodio monohidratado y tetrahidratado y el percarbonato de sodio. Especialmente preferido es el percarbonato de sodio que tiene un recubrimiento protector frente a la desestabilización por la humedad. El percarbonato de sodio que tiene un recubrimiento protector que comprende metaborato de sodio y silicato de sodio se describe en el documento GB-A-2.123.044 (Kao). El compuesto de blanqueo de peróxido está presente adecuadamente en una cantidad de desde el 5 hasta el 35% en peso, preferiblemente desde el 10 hasta el 25% en peso.

El sistema de blanqueo puede contener aparte de la fuente de peróxido de hidrógeno, tal como se describió anteriormente, también un activador o precursor de blanqueo que forma perácido para mejorar la acción de blanqueo a bajas temperaturas de lavado. Los precursores de blanqueo preferidos son los precursores del ácido peroxycarboxílico, más especialmente precursores del ácido peracético y precursores del ácido peroxibenzoico; y precursores del ácido peroxycarbónico. Son de especial interés los activadores de blanqueo tales como tetraacetiltilen-diamina (TAED) o ácido N,N-ftaloilaminoperoxycaproico (PAP). Los precursores de blanqueo de amonio y fosfonio cuaternario novedosos descritos en los documentos US-A-4.751.015 y US-A-4.818.426 (Lever Brothers Company) y EP-A-402 971 (Unilever) también son de interés. Alternativamente, pueden usarse los precursores del ácido peroxycarbónico, en particular carbonato de colil-4-sulfofenilo. También son de interés los precursores del ácido peroxibenzoico, en particular, toluiloxibencenosulfonato de N,N,N-trimetilamonio; y los precursores de blanqueo catiónicos descritos en los documentos EP-A-284292 y EP-A-303520 (Kao). El precursor de blanqueo está presente adecuadamente en una cantidad de desde el 1 hasta el 8% en peso, preferiblemente desde el 2 hasta el 5% en peso.

Alternativamente, pueden emplearse peroxiacidos inorgánicos como menopersulfato de potasio (MPS). Los hidroperóxidos de alquilo son otra clase de compuestos de blanqueo de peróxido. Ejemplos de estos materiales incluyen hidroperóxido de t-butilo e hidroperóxido de cumeno.

Opcionalmente, pueden incluirse catalizadores de blanqueo. Tales compuestos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores a base de manganeso tal como se describe en los documentos US-A-5.246.621, US-A-5.244.594, US-A-5.194.416, US-A-5.114.606, EP-A-458397 y EP-A-458398 EP-A-509787 o los catalizadores a base de hierro tal como se describe en el documento WO-A-95/34628.

También puede estar presente un estabilizador de blanqueo (secuestrante de metales pesados). Los estabilizantes de blanqueo adecuados incluyen tetraacetato de etilendiamina (EDTA) y los polifosfonatos tales como Dequest (marca registrada), EDTMP.

(d3) *Enzimas adicionales*

Las composiciones detergentes de blanqueo de la presente invención pueden comprender adicionalmente una o más enzimas, que proporcionan rendimiento de limpieza, cuidado de los tejidos y/o beneficios higiénicos. Tales enzimas incluyen oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Se describen miembros adecuados de estas clases enzimáticas en Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes, 1992, ISBN 0-12-227165-3, Academic Press. La información más reciente sobre la nomenclatura de las enzimas está disponible en Internet mediante el servidor ExPASy WWW (<http://www.expasy.ch/>). Los ejemplos de las hidrolasas son éster carboxílico hidrolasa, tioléster hidrolasa, monoéster fosfórico hidrolasa y diéster fosfórico hidrolasa que actúan sobre el enlace éster; glucosidasa que actúa sobre compuestos de O-glucosilo; glucosilasa que hidroliza compuestos de N-glucosilo; tioéster hidrolasa que actúa sobre el enlace éter; y exopeptidasas y endopeptidasas que actúan sobre el enlace peptídico. Son preferibles entre ellas la éster carboxílico hidrolasa, glucosidasa y exo y endopeptidasas. Los ejemplos específicos de hidrolasas adecuadas incluyen (1) exopeptidasas, tales como aminopeptidasa y carboxipeptidasa A y B y endopeptidasas, tales como pepsina, pepsina B, quimosina, tripsina, quimotripsina, elastasa, enteropeptidasa, cathepsina B, papaína, quimopapaína, ficaina, trombina, plasmina, renina, subtilisina, aspergillopepsina, colagenasa, clostripaina, calicreína, gastricsina, cathepsina D, bromelaina, quimotripsina C, urocinasa, cucumisina, orizina, proteinasa K, termomicolina, termitasa, lactocepsina, termolisina, bacilolisina. Se prefiere entre ellas la subtilisina; (2) glucosidasas, tales como α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa, isoamilasa, celulasa, endo-1,3(4)- β -glucanasa (β -glucanasa), xilanasa, dextranasa, poligalacturonasa (pectinasa), lisozima, invertasa, hialuronidasa, pululanasa, neopululanasa, quitinasa, arabinosidasa, exocelobiohidrolasa, hexosaminidasa, micodextranasa, endo-1,4- β -mananasa (hemicelulasa), xiloglucanasa, endo- β -galactosidasa (queratanasa), mananasa y otras enzimas que degradan gomas de sacáridos tal como se describe en el documento WO-A-99/09127. Entre ellas, se prefieren α -amilasa y celulasa; (3) éster carboxílico hidrolasa incluyendo carboxilesterasa, lipasa, fosfolipasa, pectinesterasa, colesterol esterasa, clorofilasa, tanasa y éster de cera hidrolasa.

Ejemplos de transferasas y ligasas son glutatión S-transferasa y ácido-tiol ligasa tal como se describe en el documento WO-A-98/59028 y xiloglucano endotransglucosilasa tal como se describe en el documento WO-A-98/38288.

Ejemplos de liasas son hialuronato liasa, pectato liasa, condroitinasa, pectina liasa, alginasa II. Se prefiere especialmente la pectoliasa, que es una mezcla de pectinasa y pectina liasa.

Ejemplos de las oxidoreductasas son oxidasas, tales como glucosa oxidasa, metanol oxidasa, bilirrubina oxidasa, catecol oxidasa, lacasa, peroxidasa, tales como ligninasa y las descritas en el documento WO-A-97/31090, monooxigenasa, dioxigenasa tal como lipoxigenasa y otras oxigenasas tal como se describe en los documentos WO-A-99/02632, WO-A-99/02638, WO-A-99/02639 y los sistemas de blanqueo enzimáticos basados en citocromo descritos en el documento WO-A-99/02641.

Un procedimiento para potenciar la eficacia de la acción de blanqueo de las oxidoreductasas es dirigiéndolas hacia las manchas usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tal como se describe en el documento WO-A-98/56885. También pueden añadirse anticuerpos para controlar la actividad enzimática tal como se describe en el documento WO-A-98/06812.

Una combinación preferida es una composición detergente que comprende una mezcla de la lipasa de la invención y enzimas detergentes convencionales, tales como proteasa, amilasa y/o celulasa junto con una o más enzimas que degradan la pared celular vegetal.

5 Están disponibles endopeptidasas (enzimas proteolíticas o proteasas) de diversas calidades y orígenes y que tienen actividad en diversos intervalos de pH de desde 4-12 y pueden usarse en la presente invención. Ejemplos de enzimas proteolíticas adecuadas son las subtilisinas, que pueden obtenerse de cepas particulares de *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. amiloliquefaciens* y *B. licheniformis*, tales como las subtilisinas disponibles comercialmente Savinase®, Alcalase®, Relase®, Kannase® y Everlase® suministradas por Novo Industri A/S, Copenhague, Dinamarca o Purafect®,
10 PurafectOxP® y Properase® suministradas por Genencor International. Están incluidas las variantes modificadas química o genéticamente de estas enzimas tal como se describe en el documento WO-A-99/02632, páginas 12 a 16 y en el documento WO-A-99/20727 y también variantes con alergenicidad reducida tal como se describe en los documentos WO-A-99/00489 y WO-A-99/49056.

15 Las amilasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Están incluidas las variantes modificadas química o genéticamente tal como se describe en el documento WO-A-99/02632, páginas 18, 19. Se vende celulasa comercial con el nombre comercial de Purastar®, Purastar OxAm® (anteriormente Purafact Ox Am®) por Genencor; Termamyl®, Fungamyl®, Duramyl®, Natalase®, todas disponibles de Novozymes.

20 Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Están incluidas las variantes modificadas química o genéticamente tal como se describe en el documento WO-A-99/02632, página 17. Celulasas particularmente útiles son las endoglucanasas, tales como la EGIII de *Trichoderma longibrachiatum* tal como se describe en el documento WO-A-94/21801 y la E5 de *Thermomonospora fusca* tal como se describe en el documento WO-A-97/20025. Las endoglucanasas pueden consistir en un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa o un dominio catalítico únicamente. Las enzimas celulolíticas preferidas se venden con el nombre comercial de Carezyme®, Celuzyme® y Endolase® por Novo Nordisk A/S; Puradax® se vende por Genencor y KAC® se vende por Kao corporation, Japón.

Las enzimas detergentes se incorporan normalmente en una cantidad del 0,00001% al 2%, y más preferiblemente del 0,001% al 0,5%, e incluso más preferiblemente del 0,01% al 0,2% en cuanto a la proteína enzimática pura en peso de la composición. Las enzimas detergentes se emplean comúnmente en la forma de gránulos compuestos por enzima en bruto sola o en combinación con otros componentes en la composición detergente. Se usan gránulos de enzima en bruto en una cantidad tal que la enzima pura está en del 0,001 al 50 por ciento en peso en los gránulos. Se usan los gránulos en una cantidad del 0,002 al 20 y preferiblemente del 0,1 al 3 por ciento en peso. Se conocen formas
35 granulares de las enzimas detergentes como los gránulos Enzoguard®, perlas, material granulado o gránulos en T. Pueden formularse los gránulos de modo que contengan un agente protector de enzimas (por ejemplo, antioxidantes) y/o un material retardante de la disolución. Otras formas adecuadas de enzimas son formas líquidas, tales como los líquidos de tipo "L" de Novo Nordisk, suspensiones de enzimas en tensioactivos no iónicos, tales como el tipo "SL" vendido por Novo Nordisk y enzimas microencapsuladas comercializadas por Novo Nordisk con el nombre comercial de "LDP" y "CC".
40

La enzimas pueden añadirse como componentes individuales separados (perlas, granulados, líquidos estabilizados, etc. que contienen una enzima) o como mezclas de dos o más enzimas (por ejemplo, cogramulados). Pueden estabilizarse las enzimas en detergentes líquido mediante diversas técnicas, por ejemplo, tal como se describe en los documentos
45 US-A-4.261.868 y US-A-4.318.818.

Las composiciones detergentes de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más péptidos biológicamente activos, tales como proteínas swolleninas, expansinas, bacteriocinas y péptidos que pueden unirse a las manchas.

50 (d4) Componentes opcionales adicionales

Las composiciones de la invención pueden contener un carbonato de metal alcalino, preferiblemente de sodio, con el fin de aumentar la detergencia y facilitar el procesamiento. El carbonato de sodio puede estar presente adecuadamente en cantidades que oscilan desde el 1 hasta el 60% en peso, preferiblemente desde el 2 hasta el 40% en peso. Sin embargo, las composiciones que contienen poca o ninguna cantidad de carbonato de sodio también están dentro del alcance de la invención.
55

Puede mejorarse el flujo de polvo mediante la incorporación de una pequeña cantidad de un estructurante de polvo, por ejemplo, un ácido graso (o un jabón de ácido graso), un azúcar, un acrilato o un copolímero de acrilato/maleato o silicato de sodio. Un estructurante de polvo preferido es un jabón de ácido graso, presente adecuadamente en una cantidad de desde el 1 hasta el 5% en peso.
60

Las composiciones detergentes según la presente invención también pueden comprender desde el 0,001% hasta el 10%, más preferiblemente desde el 0,01% hasta el 2%, más preferiblemente desde el 0,05% hasta el 1% en peso de agentes poliméricos de inhibición de la transferencia de tinte. Dichos agentes poliméricos de inhibición de la transferencia de tinte se incorporan normalmente en las composiciones detergentes con el fin de inhibir la transferencia de tintes desde tejidos coloreados sobre tejidos lavados con los mismos. Estos polímeros tienen la capacidad de
65

complejar o adsorber los tintes liberados que se eliminan por lavado de tejidos teñidos antes de que los tintes tengan la oportunidad de unirse a otros artículos en el lavado. Los agentes poliméricos de inhibición de la transferencia de tinte especialmente adecuados son los polímeros de Poli(N-óxido de amina), copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, polímeros de polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos.

Los agentes de eliminación de la suciedad útiles en las composiciones de la presente invención son de manera convencional copolímeros o terpolímeros de ácido tereftálico con unidades de etilenglicol y/o propilenglicol en diversas disposiciones. Se describen ejemplos de tales polímeros en los documentos legalmente cedidos US-A-4.116.885 y US-A-4.711.730 y EP-A-272033.

Otros materiales que pueden estar presentes en las composiciones detergentes de la invención incluyen silicato de sodio; agentes antirredeposición tales como polímeros celulósicos; sales inorgánicas tales como el sulfato de sodio, agentes de control de la espuma o potenciadores de la espuma según sea apropiado, estabilizadores de enzimas, inhibidores de la corrosión, tintes, motas coloreadas, perfumes, reductores de la espuma, germicidas, agentes antiempañamiento, opacificantes, blanqueadores ópticos, controladores de la espuma y compuestos de suavizado de tejidos. Esta lista no pretende ser exhaustiva.

Ahora se ilustrará adicionalmente la invención en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Blanqueo de prendas de algodón con manchas de tomate-aceite con y sin adición de diversos catalizadores metálicos y Lipolase

Se evaluó el potencial de Lipolase para potenciar el rendimiento de blanqueo de diversos catalizadores metálicos lavando muestras de algodón ensuciadas con manchas de tomate-aceite.

Se añadieron prendas manchadas con tomate/aceite de soja y se agitaron durante 30 minutos a 25°C (blancos) en la siguiente composición detergente dosificada a 2 g/l en agua Milli-Q con CaCl₂ 0,6 mM añadido. La razón de prendas con respecto al líquido de lavado era de 1:40. El pH de la disolución de lavado era de 10 al comienzo del lavado.

Composición detergente

	Tensioactivo aniónico (LAS)	23%
	Tensioactivo catiónico (Praepagen HY)	0,83%
	STPP	14,5%
	Silicato de sodio	7,2%
	Sulfato de sodio	30,0%
	Carbonato de sodio	17,5%
	CMCS	0,38%
	Tinopal CBS-X	0,06%
	Tinopal DMS	0,11%
	Tinte CI74160	0,02%
	Termamyl 60T	0,28%
	Savinase 12T	0,47%
	Humedad	5,47%

En experimentos comparativos, se realizaron las mismas pruebas en presencia de 5 µM de complejo de metal de transición, al que se hace referencia en la tabla siguiente. O bien no se añadió lipasa o bien 1 mg/l de proteína de Lipolase 100T, una lipasa comercial de Novo Nordisk o 1 mg/l de proteína de una cutinasa de *Fusarium solani pisi* tal como se describe en el documento WO-A-94/3578 (Unilever). Se disolvieron previamente las lipasas en tris(hidroximetil)-aminoetano 10 mM + NaCl 50 mM + CaCl₂ 0,4 mM ajustado a pH 8,0 con HCl. Se diluyó 6 veces esta disolución madre cuando se añadió a la disolución de lavado. Para el lavado de control sin lipasa, se añadió una cantidad similar del tampón Tris 10 mM para evitar diferencia de pH entre las disoluciones de lavado. Se disolvieron previamente los complejos de metal de transición en agua Milli-Q o en mezclas de disolvente orgánico (etanol, metanol, diclorometano) y agua hasta una concentración de 2,25 mM. Se diluyeron 30 veces estas disoluciones madre con agua Milli-Q y luego otras 15 veces cuando se añadieron a las disoluciones de lavado.

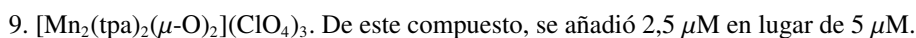
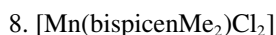
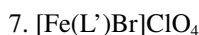
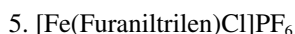
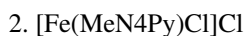
Tras el lavado, se aclararon las prendas dos veces durante 1 minuto a 22°C con tampón NaH₂PO₄ 50 mM, pH 5,0 (prenda:líquido = 1:40) y posteriormente se secaron a 37°C y se midió el cambio de color con un escáner Linotype-Hell (de Linotype). Se midió el cambio de color 2 horas después del lavado (inmediatamente después del secado)

y tras guardarlas 24 horas en una habitación oscura en condiciones ambientales. El cambio de color (incluyendo el blanqueo) se expresa como el valor ΔE . La diferencia de color (ΔE) medida entre la prenda manchada lavada y el algodón no manchado, limpio se define tal como sigue:

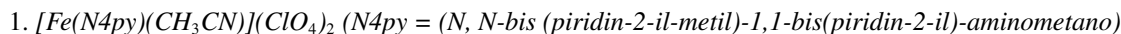
$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

en la que ΔL es una medida de la diferencia en el color oscuro entre la prenda de prueba limpia y lavada; Δa y Δb son medidas de la diferencia en el color rojo y el color amarillo, respectivamente, entre ambas prendas. Con respecto a esta técnica de medición del color, se hace referencia a la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, "Commission International de l'Eclairage"); Recomendación sobre espacios de color uniforme, ecuaciones de diferencias de color, términos de color psicométricos, suplemento nº 2 de la Publicación CIE, nº 15, Colormetry, Oficina Central de la CIE, París 1978.

Se usaron los siguientes complejos de metal de transición:



Estos complejos se sintetizaron tal como sigue:



Se sintetizó el compuesto 1 tal como se describe en el documento WO-A-95/34628 (Unilever).



Se preparó N,N-bis(piridin-2-il-metil)-1,1-bis(piridin-2-il)-1-aminoetano, MeN4Py, según el procedimiento descrito en el documento EP-A-909809 (Unilever).

Se disolvió el ligando MeN4Py (33,7 g; 88,5 mmoles) en 500 ml de metanol seco. Se añadieron pequeñas porciones de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,95 eq.; 16,7 g; 84,0 mmoles), produciendo una disolución roja transparente. Tras la adición, se agitó la disolución durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se eliminó el metanol (evaporador rotatorio). Se molió el sólido seco y se añadieron 150 ml de acetato de etilo y se agitó la mezcla hasta que se obtuvo un polvo rojo fino. Se lavó este polvo dos veces con acetato de etilo, se secó al aire y se secó adicionalmente a vacío (40°C). Anal. El. Calc. para $[\text{Fe}(\text{MeN}4\text{py})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 53,03; H 5,16; N 12,89; Cl 13,07; Fe 10,01%. Hallado C 52,29/52,03; H 5,05/5,03; N 12,55/12,61; Cl: 12,73/12,69; Fe: 10,06/10,01%.



Se sintetizó el ligando L (1H-1,4,8,11-benzotetraazaciclotridecin-2,5,7,10(6H,11H)tetrona, 13,14-dicloro-6,6-dietil-3,4,8,9-tetrahidro-3,3,9,9-tetrametilo) tal como se describe en la bibliografía (T.J. Collins *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1991), 113(22), 8419-25). Se preparó el complejo de hierro tal como se describe en otra parte en el documento WO-A-98/03625 (Universidad Carnegie-Mellon), usando una sal de litio como contraión.



(Metrilen= N-metil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-ilmetil)-etilendiamina). Se sintetizó este compuesto tal como se describe en el documento WO-A-00/27976 (Unilever).

ES 2 287 072 T3

5. $[Fe(Fe(N-(furan-2-il)-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-ilmetil)-etilendiamin)Cl)PF_6]$

Se sintetizó este compuesto tal como se describe en el documento WO-A-00/60043 (Unilever).

6. $[Fe(Bztrilen)Cl)PF_6]$

(Bztrilen= N-bencil-N,N',N'-tris(3-metil-piridin-2-ilmetil)-etilendiamina)

Se sintetizó este compuesto tal como se describe en el documento WO-A-00/27976 (Unilever).

7. $[Fe(L')Br)ClO_4]$ con $L' = 1,4-bis(quinolin-2-ilmetil)-7-etil-1,4,7-triazaciclononano$

Se sintetizó este compuesto tal como sigue:

1,4,7-triazaciclononano

Se produjo el ligando 1,4,7-triazaciclononano según el método modificado usado por el equipo del Prof. Wiegardt.

En este método, se realiza la destosilación de la 1,4,7-tris-p-toluenosulfon-1,4,7-triazacilononanamida en ácido sulfúrico caliente de 180°C. Una vez que se ha enfriado la disolución, se transfiere a éter con agitación vigorosa. Se decanta la disolución que está en la superficie y se disuelve el residuo en cierta cantidad de agua en ebullición. A la temperatura de ebullición, se añaden gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se retiran los cristales marrones que han precipitado y se lavan con ácido clorhídrico frío y luego con etanol y éter. El triclorhidrato de 1,4,7-triazaciclononano así producido se procesa luego adicionalmente tal como se describe por Wiegardt *et al* (K. Wiegardt *et al*, Chem Ber., 112, 2200 (1979)).

1,4,7-triazatriciclo [5.2.1.0⁴¹⁰]decano (ortoamida)

Se calientan hasta 150°C 0,5 mol de 1,4,7-triazaciclononano, 64,3 g, 0,54 mol de éster trietilico del ácido ortofórmico, 74,8 g, y 20 mmol de ácido p-toluenosulfónico, 4 g. Se eliminan por destilación el etanol que se produce y parte de los ésteres. Tras haberse completado la reacción, puede separarse por destilación la ortoamida a una presión de < 80 mbar en la forma de un aceite volátil amarillo brillante (p.e. 350°K a 133 Pa), de acuerdo con la bibliografía (T.J. Atkins, J. Am. Chem. Soc., 102, 6365 (1980)).

1-etil-1,4,7-triazaciclononano (Et-tacn)

En una mezcla de 0,1 mol de ortoamida, 13,92 g, disueltos en THF seco, se añadió por goteo lentamente 0,1 mol de bromuro de etilo, 10,9 g. Se agita la suspensión durante 2 días a temperatura ambiente en un matraz cerrado. Se retira el polvo microcristalino y se lava con cierta cantidad de THF seco. La sal de bromuro resultante es muy higroscópica. Se disuelve la sal en 80 ml de agua y se lleva a ebullición durante 4 horas con reflujo. Luego se añadieron 16 g de hidróxido de sodio disuelto en 20 ml de agua. Esto produce una mezcla de reacción 4 molar. Inmediatamente, se separa un aceite amarillo brillante. Para completar la reacción, se continúa la ebullición durante otras 20 horas. Tras enfriamiento, se añaden 300 ml de tolueno y se elimina por destilación el agua por medio de un separador de agua. Se filtra la mezcla de reacción y se retira el tolueno mediante un evaporador rotatorio. El producto que queda es un aceite amarillo brillante. Rendimiento: 13,8 g (89%). ¹H-RMN (CDCl₃-270 MHz; 300°K): 2,59-2,39 (m; 14H); 1,83 (s, 2H); 0,90 ppm (t; 3H); ¹³C-RMN: 52,1; 50,7; 46,5; 46,4; 12,4 ppm.

Bromuro de quinolin-2-ilmetilo

Se produce el bromuro de quinolin-2-ilmetilo tal como sigue. En este método, se ponen 0,2 mol de quinolina (30,0 g) con 0,22 mol de N-bromosuccinimida (42 g) y peróxido de dibenzoilo como iniciador en 300 ml de benceno recién destilado bajo la irradiación de luz. Se elimina por filtración la succinimida que sedimenta tras un intenso enfriamiento y se elimina en rotavapor el benceno. Se pone el aceite que queda en ácido bromhídrico al 5%. En enfriamiento con hielo, se añade una disolución saturada de carbonato de sodio a la disolución acuosa hasta un valor de pH de 7. Se retira el producto amarillento precipitado y se recristaliza en pentano.

1,4-bis(quinolin-2-ilmetil)-7-etil-1,4,7-triazaciclononano

Se disuelven 20 mmol de Et-tacn (3,12 g) en 50 ml de THF seco y se diluyen con 8 ml de trietilamina (56,8 mmol). Luego se añaden 40 mmol de bromuro de quinolin-2-ilmetilo (8,96 g), tras lo cual la disolución se vuelve marrón. Se agita la mezcla de reacción durante 3 días. se elimina por filtración el bromuro de trietilamonio resultante y se elimina en rotavapor el THF. Lo que queda es un aceite de color rojo a marrón. No pudieron separarse los subproductos (aprox. el 8%) producidos por la hidrólisis alcalina del bromuro de quinolilmetilo mediante HPLC, CG o cromatografía, del ligando analizado.

Rendimiento: 6,6 g (75%). ¹H-RMN (CDCl₃- 400 MHz; 300°K): 7,92 (d;2H); 7,89 (d;2H); 7,62 (d;2H); 7,52 (d;2H); 7,50 (m; 2H); 7,34 (m;2H); 3,87 (s;4H); 2,94 (m;4H); 2,88 (m;4H); 2,68 (m;4H); 2,53 (q;2H); 0,92 ppm (t;

ES 2 287 072 T3

3H); ^{13}C -RMN: 160,2; 147,1; 135,9; 129,0; 128,5; 127,2; 127,0; 125,8; 121,1; 64,9; 55,3; 54,3; 53,6; 51,1; 11,8 ppm. EM (EI): 439 (M^+ : int. rel. 20%; 157 (int. rel. 40% - quinolin-2-carboxaldehído); 143 (int. rel. quinolina al 100%).

[Fe(1,4-bis(quinolin-2-ilmetil)-7-etil-1,4,7-triazaciclononano)Br](ClO₄)

Se disuelve 1 mmol de 1,4-bis(quinolin-2-ilmetil)-7-etil-1,4,7-triazaciclononano, 0,44 g, en 30 ml de metanol (amarillo brillante) y se conduce a través de argón. Se añade 1 mmol de FeBr₂ (0,22) g. Se calienta la mezcla de reacción durante 2 horas con reflujo y atmósfera de argón. Se produce una disolución naranja. Se filtra la disolución a través de una frita de argón bajo una atmósfera de gas protector para eliminar el bromuro de hierro no disuelto. Se añade perclorato de sodio al filtrado y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Se produce un sólido naranja. Éste puede retirarse rápidamente mediante aire y lavarse con éter. El producto es estable al aire. Rendimiento: 400 mg (59%). Anal. Elem. Hallado: C: 48,24; H: 4,63; N: 10,02%. Calc.: C: 49,85; H: 4,89; N: 10,38%.

8. *[Mn(bispicenMe₂)Cl₂]*

Se sintetizó este compuesto tal como se describe en el documento WO-A-00/12667 (Unilever).

9. *[Mn₂(tpa)₂(μ-O)₂](ClO₄)₃*

Se sintetizó este compuesto según el procedimiento descrito por D.K. Towle, *et al* usando perclorato de sodio para la cristalización. (ref: D.K. Towle, C.A. Botsford, D.J. Hodgson, ICA, 141, 167 (1988).

Se repitió cada experimento de lavado al menos 8 veces. Se calcularon los resultados como valores de ΔE promedio frente a blanco y se compararon entre sí usando el software de análisis estadístico SAS. Los resultados, como ΔE promedio, se muestran en la tabla 1a a continuación. Un valor inferior significa un mejor resultado. La desviación estándar experimental es de 0,74. También se evaluó la sinergia entre complejo metálico y lipasa usando el software SAS (tabla 1b). En todo el conjunto de datos (N=272), la menor diferencia significativa en un intervalo de confianza del 95% para el término de interacción es de 0,18. La tabla 1 muestra el rendimiento de blanqueo de manchas del detergente con y sin complejos de metal de transición y con y sin Lipolase sobre manchas de tomate-aceite.

TABLA 1a

*Manchas de tomate/aceite en algodón.
Residuo de manchas (tras lavado) comparado con algodón limpio en ΔE*

CATALIZADOR	BLANCO	BLANCO	LIPOLASE	LIPOLASE	CUTINASA	CUTINASA
Respuesta tras (horas)	2	24	2	24	2	24
Blanco	21,54	21,78	20,86	20,88	21,71	21,89
[Fe(L')Br]ClO ₄	15,06	13,56	14,21	12,72	15,18	13,56
[Fe(Bztrilen)Cl]PF ₆	19,23	18,89	18,41	16,86	19,70	19,29
[Fe(N4py)(CH ₃ CN)](ClO ₄) ₂	21,50	21,53	19,99	19,39	21,36	21,40
[Fe(Metrilen)Cl]PF ₆	20,72	20,84	19,76	19,48	20,63	20,74
[Fe(FuranilTrilen)Cl]PF ₆	19,75	19,19	18,91	17,84	19,74	19,39
[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	20,48	17,97	18,78	14,57	20,32	17,77
[FeLCl]Li ₂	22,17	22,41	21,44	21,31	22,14	22,33
Mn(bispicenMe ₂)Cl ₂	22,39	22,47	21,23	21,00	22,36	22,33
[Mn ₂ (tpa) ₂ (μ-O) ₂](ClO ₄) ₃	21,94	22,07	20,60	20,45	21,98	22,08

TABLA 1b

*Efectos de la lipasa y el catalizador sobre las manchas de tomate/aceite.
Efectos sinérgicos significativos (** = 99% y * = 95%)*

CATALIZADOR	LIPOLASE	LIPOLASE	CUTINASA	CUTINASA
Respuesta tras (horas)	2	24	2	24
[Fe(L')Br]ClO ₄				
[Fe(Bztrilen)Cl]PF ₆		*		
[Fe(N4py)(CH ₃ CN)](ClO ₄) ₂	*	***	*	
[Fe(Metrilen)Cl]PF ₆		*		
[Fe(FuranilTrilen)Cl]PF ₆		*		
[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	***	***	*	
[FeLCl]Li ₂				
Mn(bispicenMe ₂)Cl ₂	*	*		
[Mn ₂ (tpa) ₂ (μ-O) ₂](ClO ₄) ₃	*	*		

Tal como puede observarse a partir de los valores de ΔE, el blanqueo de las manchas de tomate-aceite es mejor si están presentes tanto Lipolase como un complejo metálico. En muchos casos, se observa un efecto sinérgico entre la eliminación de manchas por Lipolase y el complejo metálico.

Ejemplo 2

Blanqueo de prendas de algodón manchadas con tomate-aceite y curry-aceite con y sin la adición de diversas lipasas y catalizadores metálicos

Se evaluó el potencial de diversas lipasas para potenciar el rendimiento de blanqueo de diversos catalizadores metálicos lavando muestras de algodón ensuciadas con manchas de tomate/aceite de soja y curry/aceite de soja tal como se describe en el ejemplo 1.

Se usó la siguiente composición detergente a 1 g/l en agua Milli-Q con CaCl₂ 0,4 mM añadido. La razón de prendas con respecto a líquido era de 1:40. El pH de la disolución de lavado nueva era de de 10. Tras el lavado, el pH había disminuido hasta aproximadamente 8. Se estudió este efecto en más detalle en el ejemplo 4.

Composición detergente

Na-LAS	24,8%
Silicato	10,2%
STPP	30,8%
Sulfato de sodio	21,4%
Carbonato de sodio	12,0%
Savinase 12T	0,77%

Se usaron los siguientes complejos:

2. [Fe(MeN4Py)Cl]Cl

4. [Fe(Mettrilen)Cl]PF₆

6. [Fe(Bztrilen)Cl]PF₆

Se usaron las siguientes lipasas disponibles comercialmente:

1. L8525 de *Candida rugosa* de Sigma-Aldrich

2. L0763 de tipo XII de *Chromobacterium viscosum* de Sigma-Aldrich

3. L9031 de *Rhizomucor miehei* de Sigma-Aldrich

4. L0382 de tipo VI-S de páncreas porcino de Sigma-Aldrich

5. L9156 de *Pseudomonas cepacia* de Sigma-Aldrich

6. L4384 de tipo XI de *Rhizopus arrhizus* de Sigma-Aldrich

7. Lipolase 100T de Novo Nordisk

8. Lipolase ultra de Novo Nordisk

9. LipoPrime 50T de Novo Nordisk

10. Lipomax 500G de Genencor International

Además, se usaron dos enzimas, no disponibles comercialmente:

11. Cutinasa de *Fusarium solani pisi* tal como se describe en el documento WO-A-94/3578 (Unilever).

12. Lumafast 2000G una lipasa vendida en el pasado por Genencor International, que se cree que es la lipasa de *Pseudomonas mendocina* tal como se describe en la patente estadounidense 5389536 concedida a Genencor Inc.

Se añadieron todas las lipasas a la disolución de lavado a una actividad igual de 10 KUL/l. Se determinó la actividad lipolítica según el método de tributirina convencional tal como se describe en el Novo SOP EB-SM-0095.02/01. Se usó Lipolase 100T, lote PPW 5593, con una actividad nominal de 101 KUL/g como la lipasa de referencia.

En experimentos comparativos, se realizaron las mismas pruebas en presencia de 5 μM de complejo de metal de transición, al que se hace referencia en la tabla siguiente. O bien no se añadió lipasa o bien 10 KUL/l de una de las anteriores lipasas.

Se llevó a cabo adicionalmente el experimento y se analizó tal como se describe en el ejemplo 1, excepto porque se midió el color o bien después de 2 horas o bien después de 3 días tras el lavado. Para facilidad de comparación con el curry-aceite sólo se muestran los datos después de 3 días y para el tomate-aceite sólo los datos después de 2 horas. Se repitieron 8 veces los experimentos con manchas de tomate-aceite; se repitieron 2 veces los experimentos con manchas de curry-aceite.

La tabla 2 muestra el rendimiento de blanqueo de manchas del detergente con y sin complejos de metal de transición y con y sin lipasa sobre las manchas de curry-aceite. La desviación estándar experimental fue de 1,1. En todo el conjunto de datos (N=70), la menor diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95% para el término de interacción sobre curry-aceite es de 0,53.

ES 2 287 072 T3

TABLA 2a

*Manchas de curry/aceite (respuesta después de 3 días).
Residuo de manchas (tras lavado) comparado con algodón limpio en ΔE*

LIPASA	Sin complejo metálico	[Fe(MeN4py)Cl]Cl	[Fe(Metrien)Cl]PF ₆	[Fe(Bztrien)Cl]PF ₆
Blanco	66,77	57,84	60,10	59,54
L4384 (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	66,83	56,05	58,36	58,34
Lipoprime 50T	66,28	53,26	57,26	56,13
Cutinasa	66,11	57,21	59,30	60,09
Lipomax 500G	66,11	54,61	58,54	57,88
Lumafast 2000G	66,22	57,19	59,72	61,00
L9031 (<i>Rhizomucor miehei</i>)	66,40	55,36	58,42	58,18
L9156 (<i>Ps. cepacia</i>)	65,68	57,04	59,28	59,81
L8525 (<i>Candida rugosa</i>)	65,58	57,20	59,13	58,41
L0763 (<i>Chromobacterium viscosum</i>)	64,75	55,51	57,22	57,34
L0382 (páncreas porcino)	65,46	57,10	59,21	59,75
Lipolase 100T	65,86	52,46	56,37	52,05
Lipolase ultra 50T	64,88	52,69	56,20	53,01

TABLA 2b

Efectos de la lipasa y el catalizador sobre manchas de curry/aceite

Efectos sinérgicos significativos (** = 99% y * = 95%).

Efectos antagonistas significativos (--- = 99% y - = 95%).

LIPASA	[Fe(MeN4py)Cl]Cl	[Fe(Metrien)Cl]PF ₆	[Fe(Bztrien)Cl]PF ₆
L4384 (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	*	*	*
Lipoprime 50T	***	***	***
Cutinasa			-
Lipomax 500G	***		
Lumafast 2000G			---
L9031 (<i>Rhizomucor miehei</i>)	***	*	
L9156 (<i>Ps. cepacia</i>)			-
L8525 (<i>Candida rugosa</i>)			
L0763 (<i>Chromobacterium viscosum</i>)			
L0382 (páncreas porcino)			-
Lipolase 100T	***	***	***
Lipolase ultra 50T	***	***	***

La tabla 3 muestra el rendimiento de blanqueo de manchas del detergente con y sin complejos de metal de transición y con y sin lipasa sobre manchas de tomate-aceite. La desviación estándar experimental es de 1,1. En todo el conjunto de datos (N=278) la menor diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95% para el término de interacción sobre tomate-aceite es de 0,26.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 287 072 T3

TABLA 3a

Manchas de tomate/aceite sobre algodón (respuesta después de 2 horas).
Residuo de manchas (tras lavado) comparado con algodón limpio en ΔE

LIPASA	Sin complejo metálico	[Fe(MeN4py)Cl]Cl	[Fe(Metrien)Cl]PF ₆	[Fe(Bztrien)Cl]PF ₆
Blanco	25,63	17,95	23,8	18,54
L4384 (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	25,88	16,07	24,48	18,16
Lipoprime 50T	25,97	15,63	24,52	18,48
Cutinasa	25,95	18,39	24,80	19,56
Lipomax 500G	25,33	16,09	25,27	19,53
Lumafast 2000G	25,00	18,15	23,64	18,91
L9031 (<i>Rhizomucor miehei</i>)	25,47	15,15	24,11	17,49
L9156 (<i>Ps. cepacia</i>)	25,62	17,73	24,15	18,71
L8525 (<i>Candida rugosa</i>)	25,98	18,32	24,88	19,17
L0763 (<i>Chromobacterium viscosum</i>)	26,14	17,33	24,54	18,07
L0382 (páncreas porcino)	26,50	18,81	24,98	18,67
Lipolase 100T	25,78	15,46	25,18	17,25
Lipolase ultra 50T	25,23	14,88	25,07	17,01

TABLA 3b

Efectos de la lipasa y el catalizador sobre manchas de tomate/aceite

Efectos sinérgicos significativos (** = 99% y * = 95%).

Efectos antagonistas significativos (--- = 99% y - = 95%).

LIPASA	[Fe(MeN ₄ py)Cl]Cl	[Fe(Metrien)Cl]PF ₆	[Fe(Bztrien)Cl]PF ₆
L4384 (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	***		*
Lipoprime 50T	***		*
Cutinasa		-	-
Lipomax 500G	***	---	---
Lumafast 2000G	-		---
L9031 (<i>Rhizomucor miehei</i>)	***		***
L9156 (<i>Ps. cepacia</i>)			
L8525 (<i>Candida rugosa</i>)		---	
L0763 (<i>Chromobacterium viscosum</i>)	***		*
L0382 (páncreas porcino)			*
Lipolase 100T	***	---	***
Lipolase ultra 50T	***	---	***

Tal como puede observarse a partir de los valores de ΔE , el blanqueo de las manchas de tomate-aceite y curry-aceite es mejor si están presentes una lipasa y un complejo metálico. En muchos casos, se observa un efecto sinérgico entre la eliminación de manchas y el complejo metálico. El efecto sinérgico es mayor para las lipasas fúngicas, tales como L4384 (*Rhizopus arrhizus*), LipoPrime, Lipolase ultra, Lipolase (que se originan todas de *Humicola lanuginosa*) y L9031 (*Rhizomucor miehei*).

Ejemplo 3

Blanqueo de prendas de algodón manchadas con tomate-aceite y curry-aceite con y sin la adición de diversas lipasas y catalizadores metálicos en diversas formulaciones detergentes

Se evaluó el potencial de diversas lipasas para potenciar el rendimiento de blanqueo de diversos catalizadores metálicos lavando muestras de algodón ensuciadas con manchas de tomate-aceite y curry-aceite, tal como se describe en los ejemplos 1 y 2. Se usaron las siguientes composiciones detergentes (% en peso)

ES 2 287 072 T3

Nombre del componente	Código de detergente			
	A	B	C	D
Tensioactivo aniónico (LAS)	24,8	17,3	17,3	15,3
Tensioactivo no iónico (Synperonic A7)	0	7,5	75	6,6
Silicato	10,2	101	10,1	8,9
STPP	30,7	31,1	31,1	27,5
Sulfato de sodio	21,3	21,3	21,3	18,9
Carbonato de sodio	12,0	12,4	12,4	11,0
Percarbonato de sodio	0	0	0	6,9
TAED (83%)	0	0	0	2,0
Dequest 2047	0	0	0	2,3
Savinase 12T	1	0,3	0,3	0,7
pH (ajustado con HCl)	10,0	10,0	9,0	9,0

Se dosificaron los detergentes anteriores a

detergente A 1 g/l en agua Milli-Q con CaCl_2 0,4 mM;

detergente B 3 g/l en agua Milli-Q con CaCl_2 2,0 mM;

detergente C 3 g/l en agua Milli-Q con CaCl_2 0,8 mM;

detergente D 3 g/l en agua Milli-Q con CaCl_2 0,8 mM.

Se usó el complejo de metal de transición $[\text{Fe}(\text{MeN}_4\text{Py})\text{Cl}]\text{Cl}$ a $7,7 \mu\text{M}$. Se añadieron lipasas a 10 mg/l de proteína enzimática. Se llevó a cabo adicionalmente el experimento y se analizó tal como se describe en los ejemplos 1-3, excepto porque se midió el color 24 horas después del lavado.

Se observó un claro beneficio de eliminación de manchas para los que tenían tanto un complejo metálico como una lipasa (preferiblemente Lipolase y variantes de Lipolase) en los detergentes anteriores A,B,C,D. Para ilustrar el efecto, se calculó la diferencia entre la eliminación de manchas por la lipasa en ausencia (nada) y en presencia de $[\text{Fe}(\text{MeN}_4\text{Py})\text{Cl}]\text{Cl}$. Tal como se muestra en la tabla 4 para el curry-aceite, el efecto de la lipasa es mucho mayor en presencia del complejo metálico.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

*Manchas de curry/aceite en algodón (respuesta tras 24 horas).
Efecto de la enzima en ΔE . Un valor más bajo es un resultado mejor*

Enzima	Catalizador	Detergente			
		A	B	C	D
Lipoprime 50T	Ninguno	1,18	0,68	-1,69	1,65
Lipoprime 50T	[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	-5,09	-9,14	-9,20	-9,28
Lipolase Ultra 50T	Ninguno	-0,65	0,38	-1,68	-0,48
Lipolase Ultra 50T	[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	-7,46	-8,31	-6,44	-5,35
Lipolase 100T	Ninguno	0,42	-1,08	0,58	0,45
Lipolase 100T	[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	-7,01	-9,18	-6,43	-5,90
Lumafast 2000G	Ninguno	0,71	0,46	0,17	0,05
Lumafast 2000G	[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	-0,45	-0,27	-1,33	0,36

Ejemplo 4

Blanqueo de prendas de algodón manchadas con tomate-aceite y curry-aceite con y sin la adición de Lipolase y catalizadores metálicos

Se repitió el efecto de limpieza sinérgico de Lipolase y [Fe(MeN4Py)Cl]Cl tal como se observó en el ejemplo 2 sobre manchas de tomate/aceite y curry/aceite. Se realizó el experimento de lavado en una composición detergente tal como se describe en el ejemplo 2 dosificada a 1 g/l en agua Milli-Q con CaCl₂ 0,4 mM y temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). La concentración de Lipolase fue de 1 mg de proteína por litro y del complejo metálico 5 μ M. La razón de prendas con respecto a líquido fue de 1:65. Tras el lavado, se aclararon las manchas con agua corriente en exceso (16°FH con Ca²⁺:Mg²⁺ = 4:1). A las manchas de curry-aceite se les dio un aclarado final de 5 minutos con 50 mM de tampón fosfato de sodio pH 5. Se secaron en secadora de tambor las prendas aclaradas a baja temperatura. Se midieron las manchas antes del lavado e inmediatamente después del secado. La eliminación de manchas se expresó en ΔE , calculada a partir de los factores cromáticos L*, a* y b* de la manchas antes y después del lavado. Los efectos de limpieza se facilitan en la tabla 5. Dado que la ΔE en este experimento se expresa como la diferencia entre después del lavado y antes del lavado, un número mayor significa un mejor resultado. Se muestran los datos como el promedio de 3 repeticiones. La desviación estándar experimental con tomate-aceite = 2,9 (df 8) y con curry-aceite = 1,7 (df 8).

TABLA 5a

Eliminación de manchas de Lipolase y [Fe(MeN4Py)Cl]Cl en detergente 1 g/l

	Tomate/aceite	Curry/aceite
Control	17,5	22,4
Lipolase	19,8	20,4
[Fe(MeN4Py)Cl]Cl	23,8	24,4
Lipolase + [Fe(MeN4Py)Cl]Cl	35,8	24,7

Puesto que se usó una dosificación de detergente baja de 1 g/l, la adición de Lipolase en tampón Tris-Cl, la actividad lipasa y la disolución de la mancha pueden influir en el pH de la disolución de lavado. Por tanto, en este experimento el pH de la espuma se midió inmediatamente después del lavado (tabla 5).

ES 2 287 072 T3

TABLA 5b

pH de la disolución de lavado al final del lavado

5		Tomate/aceite	Curry-aceite
	Control	8,6	9,5
	Lipolase	7,6	8,8
10	[Fe (MeN4Py) Cl]Cl	7,8	9,2
	Lipolase + [Fe (MeN4Py) Cl]Cl	7,6	n.d.
15	(n.d. = no determinado)		

20 El pH inicial de la disolución detergente era de 9,98. Tal como está claro, el pH de la disolución de lavado disminuye en particular para las manchas de tomate-aceite. Sin embargo, esta disminución no puede explicar la notable sinergia entre el catalizador y la lipasa. Se espera que la disminución en el pH sea menor para las otras formulaciones detergentes usadas en los ejemplos 1 y 3.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

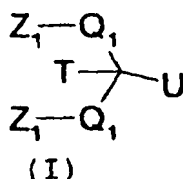
REIVINDICACIONES

1. Composición detergente enzimática que comprende:

(a) tensioactivo,

(b) 10 - 20.000 UL por gramo de la composición detergente de una enzima lipolítica que puede obtenerse a partir de *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Rhizomucor miehei*, y

(c) un ligando N-donador polidentado sin puentes cruzados que puede formar un complejo con un metal de transición, en el que dicho complejo puede catalizar el blanqueo de manchas en tejidos por medio del oxígeno atmosférico, en el que el ligando está definido por la fórmula general (I) o un complejo de metal de transición del mismo, preferiblemente de hierro, manganeso, cobre o cobalto,



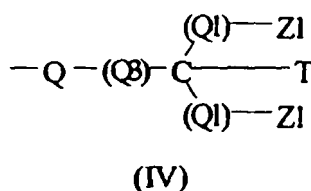
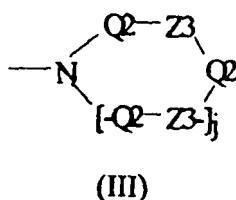
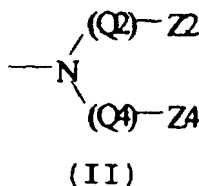
en la que:

los grupos Z_1 representan independientemente un grupo coordinante seleccionado de un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido que se selecciona de piridina, pirimidina, pirazina, pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoquinolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tiazol;

Q_1 es $[CR_1R_2]_n$ con R_1 y R_2 seleccionados cada uno independientemente de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -R y -OR, en los que R representa alquilo, alquénilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado de carbonilo con $n = 0, 1$ ó 2 ;

T representa un grupo no coordinado seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -R y -OR, en los que R representa alquilo, alquénilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado de carbonilo, estando R opcionalmente sustituido por uno o más grupos funcionales E;

U representa un grupo coordinante de la fórmula general (II), (III) o (IV):



en las que:

Q2 y Q4 se definen independientemente como para Q₁; y

5 cada Q3 representa un enlace covalente o un alquileo C₁-C₄, preferiblemente un enlace covalente;

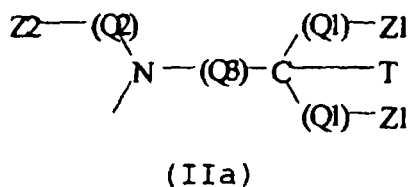
Q representa -N(T)- (en el que T se define independientemente como antes), o un anillo heterocíclico opcional-
mente sustituido o un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido seleccionado de piridina, pirimidina, pirazina,
10 pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoquinolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tiazol;

Z2 se define independientemente como para Z₁;

los grupos Z3 representan independientemente -N(T)- (en el que T se define independientemente como antes);

15 Z4 representa un grupo coordinante o no coordinante seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, -NH-C(NH)
NH₂, -R y -OR, en los que R= alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o un grupo derivado
de carbonilo, estando R opcionalmente sustituido, o

Z4 representa un grupo de la fórmula general (IIa):



y

$$1 \leq j < 4.$$

2. Composición detergente según la reivindicación 1, en la que la lipasa se selecciona del grupo que consiste en
Lipolase, Lipolase ultra, LipoPrime, Lipomax, Liposam.

3. Composición detergente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que Z₁, Z₂ y Z₄ represen-
tan independientemente grupos seleccionados de piridin-2-ilo opcionalmente sustituido, imidazol-2-ilo opcionalmente
sustituido, imidazol-4-ilo opcionalmente sustituido, pirazol-1-ilo opcionalmente sustituido y quinolin-2-ilo opcional-
mente sustituido.

4. Composición detergente según la reivindicación 3, en la que Z₁, Z₂ y Z₄ representan cada uno piridin-2-ilo
opcionalmente sustituido.

5. Composición detergente según la reivindicación 3, en la que los grupos Z₁ representan grupos idénticos.

6. Composición detergente según la reivindicación 1, en la que T representa hidrógeno, hidroxilo, metilo, etilo,
bencilo o metoxilo.

7. Composición detergente según la reivindicación 1, en la que Z₂ representa un anillo heterocíclico opcional-
mente sustituido o un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido seleccionado de piridina, pirimidina, pirazina,
pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoquinolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tia-
zol, preferiblemente piridin-2-ilo opcionalmente sustituido o bencimidazol-2-ilo opcionalmente sustituido, y en la que
Z₄ representa un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido o un anillo heteroaromático opcionalmente sustituido
seleccionado de piridina, pirimidina, pirazina, pirazol, imidazol, bencimidazol, quinolina, quinoxalina, triazol, isoqui-
nolina, carbazol, indol, isoindol, oxazol y tiazol, preferiblemente piridin-2-ilo opcionalmente sustituido, o un grupo
no coordinante seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo o bencilo.

8. Composición detergente según la reivindicación 1, en la que el ligando se selecciona de:

1,1-bis(piridin-2-il)-N-metil-N-(piridin-2-ilmetil)metilamina;

N,N-bis(piridin-2-il-metil)-bis(piridin-2-il)metilamina, denominado a continuación en el presente documento co-
mo N4Py.

N,N-bis(piridin-2-il-metil)-1,1-bis(piridin-2-il)-1-aminoetano, denominado a continuación en el presente docu-
mento como MeN4Py,

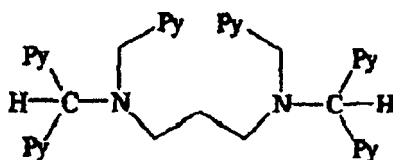
N,N-bis(piridin-2-il-metil)-1,1-bis(piridin-2-il)-2-fenil-1-aminoetano, denominado a continuación en el presente documento como BzN4Py

1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(6-metil-piridin-2-ilmetil)metilamina;

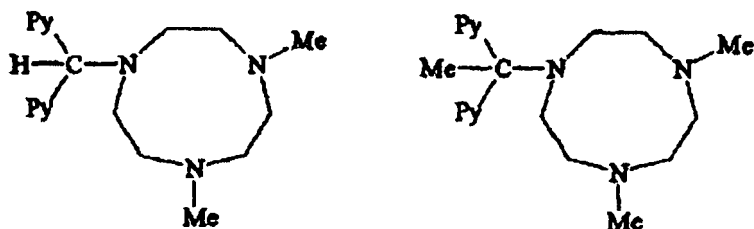
1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(5-carboximetil-piridin-2-ilmetil)metilamina;

1,1-bis(piridin-2-il)-1-bencil-N,N-bis(piridin-2-ilmetil)metilamina; y

1,1-bis(piridin-2-il)-N,N-bis(bencimidazol-2-ilmetil)metilamina,



en la que -Py representa piridin-2-ilo,



en las que -Py representa piridin-2-ilo.

9. Composición detergente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una dosis unitaria proporciona una concentración acuosa de catalizador de blanqueo por aire en el intervalo de 0,1 a 10 μ M y una concentración de lipasa en el intervalo de 0,01 - 10 KUL/l.