



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0311200-4 B1



(22) Data do Depósito: 01/05/2003

(45) Data de Concessão: 27/08/2019

(54) Título: ARTIGO PARA USO EM UM PROCESSO ENZIMÁTICO DE LIMPEZA MANUAL DE TECIDO, KIT DE PARTES E MÉTODO PARA LIMPEZA MANUAL DE TECIDO

(51) Int.Cl.: C11D 17/04; C11D 3/38.

(30) Prioridade Unionista: 23/05/2002 EP 02253631.2.

(73) Titular(es): UNILEVER N.V.

(72) Inventor(es): JAMES ROBERT DARWENT; SANDRA HEMMINGTON; NEIL JAMES PARRY.

(86) Pedido PCT: PCT EP2003004706 de 01/05/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/099987 de 04/12/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/11/2004

(57) Resumo: "ARTIGO PARA USO EM UM PROCESSO ENZIMÁTICO DE LIMPEZA DE TECIDO, KIT DE PARTES E MÉTODO PARA LIMPEZA DE TECIDO". Um artigo para uso em um processo enzimático de limpeza de tecido, dito artigo contendo um ou mais tipos de microorganismos inofensivos capazes de excretar enzimas úteis no dito processo de limpeza de tecido. Além disso, é proporcionado um método de limpeza de tecidos pelo qual os tecidos manchados são embebidos com água na presença do dito artigo.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

ARTIGO PARA USO EM UM PROCESSO ENZIMÁTICO DE LIMPEZA MANUAL DE TECIDO, KIT DE PARTES E MÉTODO PARA LIMPEZA MANUAL DE TECIDO

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se refere a um artigo para uso em um processo enzimático de limpeza e para o uso do dito artigo em um processo enzimático de limpeza. O artigo é especialmente útil para o mercado de lavagem à mão como pode ser usado em um processo enzimático de limpeza de tecido de baixo custo.

Fundamentos

[0002] Em muitos países do mundo, tecidos são lavados com a mão. O processo convencional de lavagem de tecidos com a mão é um trabalho muito intenso para quem lava, requerendo a aplicação repetida do sabão, usualmente de barras, ou pós de detergente de baixo custo seguido de fricção e batidas para remover manchas rebeldes. É portanto desejável fazer esse processo mais eficaz e conveniente para o usuário. O processo poderia ser auxiliado intensamente pela aplicação de enzimas de modo a interromper as proteínas e/ou manchas de comida oxidadas. Entretanto, enzimas são os ingredientes mais caros das formulações de detergente e a adição de enzimas a formulações para lavagem pela mão iria aumentar o custo de um produto além do bolso de muitos usuários. Outro problema associado com o processo de lavagem pela mão convencional é, que a sujeira e o corante removidos no processo é frequentemente redepositado sobre os tecidos lavados, a fim de que o resultado de limpeza total é de vez em quando decepcionante.

[0003] É portanto um objeto da presente invenção fornecer um processo enzimático novo para lavar tecidos pela mão, aos quais superam os empecilhos mencionados acima. Surpreendentemente, foi descoberto que os empecilhos acima mencionados podem ser superados pelo o artigo de acordo com a invenção, dito artigo contendo um ou mais tipos de microorganismos inofensivos

capazes de excretar enzimas úteis no dito processo de limpeza de tecido.

Definição Da Invenção

[0004] De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é fornecido um artigo para uso em um processo enzimático de limpeza de tecido, dito artigo contendo um ou mais tipos de microorganismos inofensivos capazes de excretar enzimas úteis no dito processo de limpeza de tecido.

[0005] De acordo com um segundo aspecto da invenção, é fornecido um processo enzimático de limpeza para tecidos, pelos quais tecidos manchados são embebidos com água na presença do artigo de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada Da Invenção

[0006] O artigo de acordo com a invenção para uso em um processo enzimático de limpeza de tecido contém um ou mais tipos de microorganismos inofensivos capazes de excretar enzimas úteis no dito processo de limpeza de tecido. O artigo pode estar na forma de um grânulo poroso, um tecido tipo esponja, ou uma bolsa ou sachê permeável a água. Ele contém microorganismos inofensivos de tal maneira que eles podem ser efetivamente contidos dentro do artigo e não podem dispersar dele para dentro da água de lavar. Por exemplo, eles podem estar imobilizados em um material polimérico orgânico dentro de uma bolsa permeável a água feita de derivado de polímero plástico ou celulósico. Em uso, o artigo é colocado em um balde junto com os tecidos que estão para ser limpos e deixados para permanecer com água por algum tempo. Esse processo de embebedimento irá liberar parte da mancha dos tecidos. A mancha dissolvida irá compreender algumas moléculas orgânicas que podem ser utilizadas pelos microorganismos como um carbono e fonte de energia para gerar uma faixa de diferentes enzimas na solução de lavar. Assim, o artigo permite os microorganismos utilizar um carbono externo e fonte de energia que é capaz de se transferirem através do artigo. O carbono e fonte de energia podem também ser supridos com o artigo no primeiro momento tal que enzimas de limpeza são

produzidas sobre umedecimento. Isso permite atividade de limpeza ocorrer relativamente independentemente da presença e natureza dos componentes da mancha.

[0007] E especialmente útil se, em adição as enzimas, os microorganismos sejam também capazes de produzir outras entidades químicas que contribuam para o processo de limpeza, i.e., biotensoativos, por exemplo lipopolisacarídeos. Exemplos de lipopolisacarídeos adequados são descritos na EP-A-924 221.

[0008] Além disso, a matriz em que os microorganismos estão imobilizados pode também atuar como um absorvente a fim de remover particulados, corantes e/ou óleos da água de lavar. Em outra modalidade, é fornecido um sistema de duplo propósito, que compreende uma bolsa contendo uma enzima que produz microorganismos e outra bolsa separada (“bolsa de ligamento”) para limpar a água, absorver corante etc. Essa bolsa de ligamento pode ser usada no pré-tratamento da água que é para ser usada para lavagem. Seu objetivo é remover parte ou todo de quaisquer particulados, óleos ou corantes. Isso é especialmente útil para área onde o meio-ambiente sujo é grande. A mudança na cor da bolsa e seus conteúdos libera uma forte orientação ao consumidor e reforça a mensagem que a água de lavar é suficientemente limpa e pronta para uso.

[0009] Os microorganismos usados na invenção são microorganismos inofensivos; i.e., eles não são perigosos para humanos e não produzem substâncias que são potencialmente tóxicas ou outro perigo para humanos ou o meio-ambiente. Os microorganismos são capazes de produzir e secretar enzimas para lavagem úteis tais como oxidoredutases, carbohidrases, proteases, lipases, transferases e glicosidasas. Exemplos de tais microorganismos são fungo e/ou bactéria, tais como *Penicillium sp*, *Curvularia sp*, *Trametes sp*, *Hansenula sp*, *Pyricularia sp*, *Hordeum sp*, *Rhizopus sp*, *Cândida sp*, *Trichoderma sp*, *Aspergillus sp*, *Cellulomas sp*, *Streptococcus sp*, *Bacillus sp*, *Flavobacterium sp* etc. A cepa dos microorganismos pode ser geneticamente modificada para gerar superprodução de variantes. Tais cepas superproduzidas são utilizadas atualmente na fabricação em larga escala de enzimas pela fermentação para

aplicações industriais.

[0010] A enzima pode ser selecionada de oxidoredutases (tais como oxidases de açúcar, peroxidases, lacases, oxidases de fenol), carbohidrases (tais como celulasas, hemicelulasas, pectinases, amilases), proteases, lipases, transferases e glicosidases. Oxidases são enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogênio. Exemplos úteis de oxidases são oxidase de amina, oxidase de aminoácido, oxidase de colesterol, oxidase de ácido úrico e oxidase de xantina. As oxidases preferidas são oxidase de glicose, oxidase de galactose e oxidase de álcool. Especialmente preferida é a oxidase de alanol C₁-C₄ obtida de uma cepa da *Hansenula Polymorpha* de catalase negativa, como descrita na EP-A-244 920 (Unilever). O peróxido de hidrogênio gerando enzima pode ser usado em combinação com um ativador, por exemplo um que gera ácido peracético. Tais ativadores são bem conhecidos na técnica e incluem tetracetililenodiamina (TAED) e nonaoil-oxibenzenosulfonato de sódio (SNOBS). Esses e outros compostos relacionados são descritos em todos os detalhes por Grime e Clauss em Chemistry & Industry (15 de outubro de 1990) 647-653. Alternativamente, um catalisador de metal de transição poderia ser usado em combinação com o peróxido de hidrogênio gerando enzima para aumentar o poder de alvejamento. Exemplos de catalisador de manganês são descritos por Hage et al. (1994) Nature 369, 637-639. Alternativamente, a enzima é um haloperoxidase, uma enzima capaz de gerar um hipohaleto de um íon haleto. Haloperoxidases preferidas são cloro- peroxidases e o composto químico de alvejamento correspondente é hipoclorito. Cloroperoxidases especialmente preferidos são cloroperoxidases de vanádio, por exemplo da *Curvularia inaequalis*. Alternativamente, peroxidases ou lacases podem ser usadas. Exemplos de sistemas de lacase/melhorador são dados no WO-A-95/01426. Exemplos de sistemas de peroxidase/ melhorador são dados no WO-A-97/11217.

[0011] Uma vez uma enzima adequada seja escolhida, é relativamente fácil para o homem especializado isolar um microorganismo adequado capaz de produzir a enzima sob condições de lavagem. Para esse fim, microorganismos

são protegidos por suas capacidades de produzir a enzima desejável sob condições de lavagem, em um teste que se parece com as condições de lavagem mais próximo possíveis.

[0012] Se desejado, o artigo da presente invenção pode também conter, em adição aos microorganismos, ingredientes de detergente convencionais tais como tensoativos, reforçadores, agentes sequestrantes, abrillantadores óticos, perfumes, etc, desde que esses ingredientes sejam compatíveis com os microorganismos. As quantidades desses ingredientes podem ser otimizadas pela simples experimentação.

[0013] O artigo da presente invenção pode ser vantajosamente usado em um processo enzimático de lavar à mão para limpeza de tecidos. Nesse processo, tecidos manchados são embebidos com água na presença do artigo de acordo com a invenção como descrita acima. Após o período de embebedimento que pode ser estendido acima de 15 minutos para muitas horas ou mesmo dias, a água de lavar é descartada e os tecidos são condicionados completamente. Nessa etapa, os tecidos podem ser suficientemente limpos para serem secos ou podem necessitar de uma etapa de lavagem a mais usando mais produtos de detergente convencionais tais como barras de sabão ou pós de detergente. O efeito de tal etapa de lavagem a mais será notadamente melhor em virtude da presença do primeiro tratamento.

[0014] A invenção será agora ilustrada pelos seguintes exemplos, não limitativos. Nos desenhos que acompanham:

[0015] Figura 1a mostra a presença de enzima oxidativa na cultura sobrenadante produzida do *Penicillium pinophilum*, figura 1b mostra a redução da intensidade do corante RR6 na cultura sobrenadante do mesmo.

[0016] Figuras 2a e 2b mostram a presença de ambas oxidase de açúcar e lacase nas culturas sobrenadantes de *Trametes versicolor*.

[0017] Figura 3 mostra a produção de oxidase de açúcar em um protótipo de sachê.

[0018] Figura 4 mostra atividade de oxidase de açúcar nas culturas de

biobag.

[0019] Figura 5 mostra atividade de lacase nas culturas de biobag.

[0020] Figura 6 mostra interpretação gráfica da performance de biobag em manchas de óleo de tomate. Na figura 6,

Frasco 1 & 2 = Biobag,

Frasco 3 = Biobag mais melhorador,

Frasco 4 = melhorador somente.

[0021] Ordem de porção removida: [1] = removida depois de 1 hora, [2] = removida depois de 4 horas.

Exemplo 1

[0022] Alvejamento de corante RR6 com oxidase de açúcar produzido do *Penicillium pinophilum*.

[0023] Um meio definido contendo sacarose como uma fonte de carbono foi inoculado com esporos e micélias de *Penicillium pinophilum*. Corante vermelho 6 Reativo foi também adicionado a esse meio. O meio inoculado foi cultivado com agitação a 30°C e amostras foram tiradas periodicamente. As amostras foram testadas para atividade da enzima e diferenças na intensidade do corante.

[0024] Figura 1 mostra a atividade da oxidase do açúcar nas culturas PP1, 2 e 3 (somente PP3 continha RR6). Todos frascos mostram boas atividades. Figura 1a mostra a redução de RR6 na cultura PP3, total de 70% de corante foi alvejado.

(i) Alvejamento de corante RR6 de enzimas produzidas pelo *Trametes*

Versicolor

[0025] Um meio complexo foi inoculado com micélias de *Trametes Versicolor* e monitorado para produção de enzima. Ambas produção de oxidase de açúcar e lacase foram detectadas. Nesse momento, RR6 foi adicionado e amostras foram tiradas ao tempo. Figuras 2a e 2b mostram a identificação de atividade de enzima.

Exemplo 2

[0026] Imobilização e crescimento de microorganismos no suporte de

matriz

(i) Ativação da membrana

[0027] Uma membrana estéril foi ativada com micélias e esporos de *Penicillium pinophilum* tirados da placa de agar de dextrose de batata. A membrana foi então adicionada a uma placa de Petri estéril contendo 1 ml do estéril, 10% de sacarose e deixado a 30°C para secar por toda a noite. A membrana foi então armazenada em um frasco selado a 4°C até exigida. A membrana foi colocada em uma bolsa PET e fechada com uma presilha de diálise estéril. A bolsa foi colocada em um frasco com anteparo contendo 100 ml de calda de crescimento de fungo e colocado em um incubador de agitação a 20°C a noite toda.

(ii) Ensaio para atividade de oxidase de açúcar

[0028] Uma amostra de cultura foi removida e girada a 13.000 rpm em um microfungo por 5 minutos. O sobrenadante foi então filtrado com um filtro de 0,2 µm em um tubo estéril. O sobrenadante (membrana PP 24 horas) foi diluído em tampão de fosfato estéril com pH 6,5 e alíquotas de 100 µL foram dispensadas nos reservatórios de uma placa microtitulada. Substrato contendo 10 mM de glicose, 1 µg/mL de enzima peroxidase e 10 µg/mL de TMB em 0,1 M de fosfato com pH 6,5 foi adicionado a 10 µL/depósito para cada diluição e deixado desenvolver. A reação foi interrompida pela adição de 100µL/depósito em 1M de HCl e lido a 450 nm.

Exemplo 3

Ativação e avaliação dos *Trametes versicolor* imobilizados em uma matriz absorvente.

(i) Cultura de Trametes versicolor no agar de dextrose de batata.

[0029] Agar de dextrose de batata foi vertido em 20 cm de placa de Petri e deixado assentar. Micélias foram tiradas de uma cultura de *Trametes versicolor* em um agar inclinado, e espalhado sobre toda superfície da placa PDA com um circuito estéril. A placa foi incubada a 30°C por 4 dias, até um emaranhado de micélias tivesse crescido.

(ii) Inoculação de meio de cultura

[0030] Uma pequena tampa foi removida da placa de cultura e colocada em um frasco de 250 ml contendo 100 ml de meio VT. O frasco foi colocado em incubador de agitação a 29°C e testado acima do curso por 4 dias para produção de enzima.

(iii) Colonização de absorvente sintético

[0031] Um material absorvente sintético comercialmente disponível foi tratado com UV para inicialmente esterilizar e remover contaminantes. Depois de 4 dias de crescimento a cultura de *Trametes versicolor* foi espessada com biomassa e a produção de enzima oxidase repicou e estava em diminuição. Isso foi devido ao substrato esgotado.

[0032] Nesse momento, 100 ml meio de VT fresco foi adicionado e aproximadamente 4 g de absorvente. Reposto o recipiente a 29°C com balanço por mais 24 horas. Despejado fora o excesso de líquido do recipiente (alguns devem ter sido absorvidos pelo absorvente), maioria da biomassa tinha agregado envolta dele. O absorvente ativado foi colocado sobre uma placa de Petri esterilizada larga e 1 ml de 20% de sacarose e 10 ml de 0,5% de extrato de malte foram adicionados. O material coberto foi colocado a 37°C por 48 horas antes de o colocar a 4°C em armazenamento.

(iv) Preparação e uso de simples biobolsas

[0033] Bolsas de tecido feitas de tereftalato de polietileno (PET) foram tratadas com UV para inicialmente esterilizar e remover contaminantes. Três dessas bolsas foram filtradas com absorvente colonizados de *Trametes*, aproximadamente 7,6 g foi adicionada por bolsa. As bolsas foram fechadas com presilhas que foram tratadas com álcool etílico a 70% para remover microorganismos. Outra bolsa foi preparada com absorvente seco não colonizado; aproximadamente 2 g por bolsa foi usado, uma pequena quantidade foi adicionada para tomar conta da umidade e biomassa.

[0034] Cada bolsa foi colocada em um frasco de 250 ml contendo 150 ml de meio VT e colocado a 29°C com agitação. Amostras foram tiradas após 3, 24 e

48 horas e testado para atividade de oxidase de açúcar (Figura 4) e atividade de lacase (Figura 5). Para testar atividade de alvejamento do sistema, duas manchas de óleo de tomate foram adicionadas a cada um dos 4 frascos, ao frasco 3 (absorvente ativado) e frasco 4 (absorvente não ativado) 50 /xm de PTP foi adicionado para ver o efeito de um melhorador. Os frascos foram recolocados no incubador de agitação por 1 hora antes de um pedaço ser removido de cada frasco. Cada pedaço foi condicionado em água desmineralizada estéril e colocada a 30°C no escuro para secar. Os frascos foram recolocados no incubador de agitação por mais três horas, após o que os pedaços remanescentes foram removidos condicionados ao final para secar.

[0035] Os tecidos secos foram medidos usando um Macbeth CE7000 e o AE das manchas foi determinado contra a mancha não tratada. Os resultados são mostrados na tabela 1 e figura 6.

[0036] Nos sobrenadantes tirados das culturas de Biobag atividade de oxidase de açúcar foi detectada nos frascos 1-3 após 3 horas, essa atividade diminuiu ligeiramente após 24 horas mas foi bem mantida durante o curso do experimento. Lacase foi detectada após cultura de 24 horas e foi aumentada por 48 horas para o início do experimento. A biobag em branco mostrou nenhuma produção de qualquer enzima.

[0037] Os resultados mostram uma diferença significativa na quantidade de mancha removida nos frascos 1 e 3 após a primeira hora do tratamento. O frasco 4 contendo a biobag não ativada também mostra alguma remoção de mancha. Após 4 horas, a remoção da mancha foi aumentada significativamente em todos os frascos contendo as biobags ativadas. Quando o melhorador estava presente (frasco 3) o nível de remoção de mancha, comparado ao frasco com a biobag somente, foi melhorada em 7 unidades na primeira hora e aproximadamente 13 unidades após 4 horas. Este exemplo mostra produção de enzima com sucesso e remoção de mancha por meio de uma artigo de acordo com a invenção.

Tabela 1: Resultados de Delta E das manchas após tratamento com Biobag

Frasco	Amostra	L	a	b	L*	a*	b*	ΔE	$\Delta\Delta E$
<u>1</u>	1	72,084	17,361	39,728	81,691	7,874	32,288	15,414	3,464
<u>1</u>	3	73,931	17,374	40,802	85,806	4,368	28,288	21,6049	6,7849
<u>2</u>	6	73,379	15,921	38,462	81,481	8,316	33,645	12,1112	0,1612
<u>2</u>	5	72,522	16,889	39,368	85,201	5,118	27,664	20,8877	6,0677
<u>3</u>	8	72,559	16,882	38,465	84,212	4,978	23,379	22,4741	10,524
<u>3</u>	7	73,671	14,731	36,942	91,079	0,295	11,476	34,0580	19,238
4 em branco	11	73,929	15,403	39,048	81,154	8,557	32,402	11,9485	-
4 em branco	9	71,132	17,621	38,486	81,154	8,557	32,402	14,8193	-

Data da amostra é dada em ordem de remoção i.e., 1 hora seguida por 4 horas.

* Indica leitura após tratamento no sistema Biobag.

Reivindicações

1. Artigo para uso em um processo enzimático de limpeza manual de tecido, **caracterizado** pelo fato de que ele contém um ou mais tipos de microorganismos inofensivos capazes de excretar enzimas selecionadas do grupo que consiste de oxidoredutases, carboidrases, proteases, lipases, transferases e glicosidades,

em que o dito artigo está na forma de um sachê, dito sachê sendo permeável às ditas enzimas, mas impermeável aos ditos microorganismos e,

em que o dito sachê contém uma matriz sobre a qual os microorganismos são imobilizados.

2. Artigo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os ditos microorganismos são imobilizados sobre uma matriz, em que a dita matriz é em si capaz de absorver sujeira particulada, corantes e/ou óleo.

3. Artigo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de que ainda compreende um melhorador para dita enzima.

4. Artigo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende o artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes e um artigo separado que compreende um material absorvedor.

5. Kit de partes, **caracterizado** pelo fato de que compreende o artigo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, e um artigo separado que compreende um material absorvedor.

6. Método para limpeza manual de tecido, **caracterizado** pelo fato de que tecidos manchados são embebidos com água na presença do artigo conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o tecido é algodão, poliéster, poliéster/algodão ou lã.

Fig.1a.

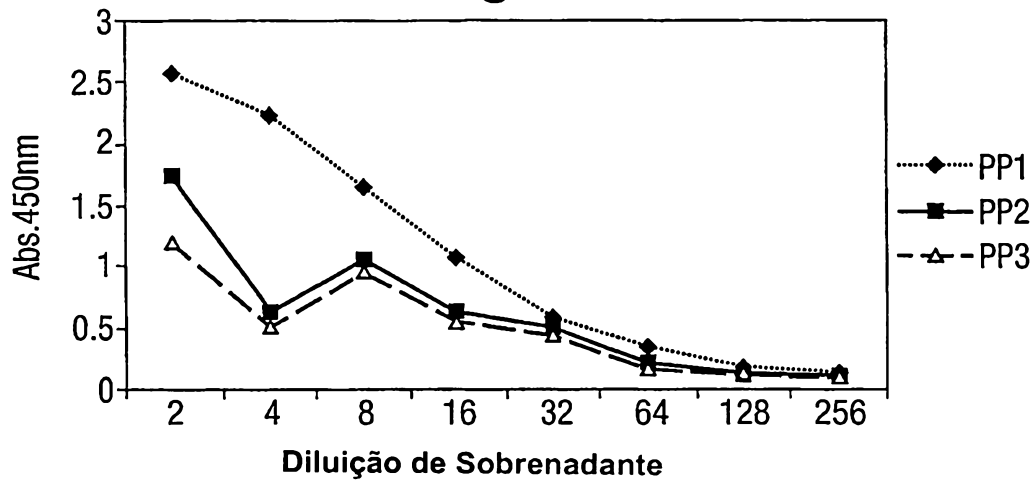


Fig.1b.

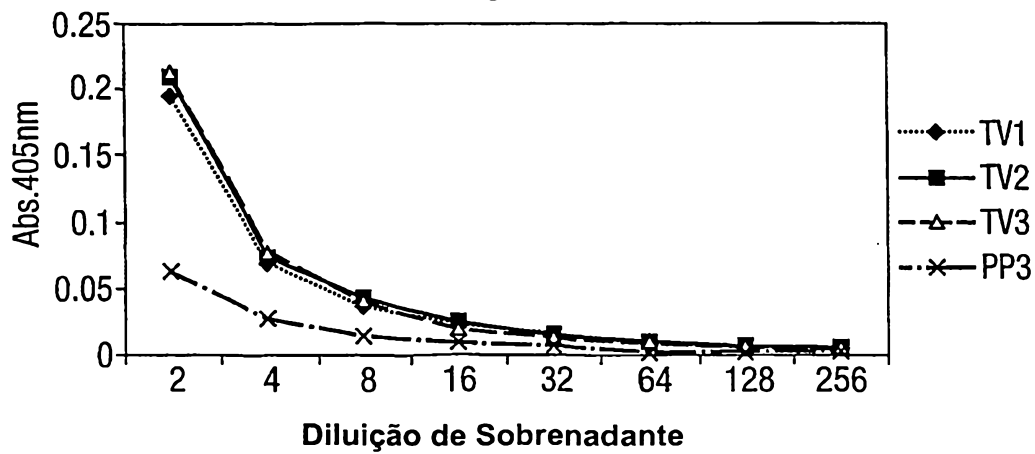


Fig.2a.

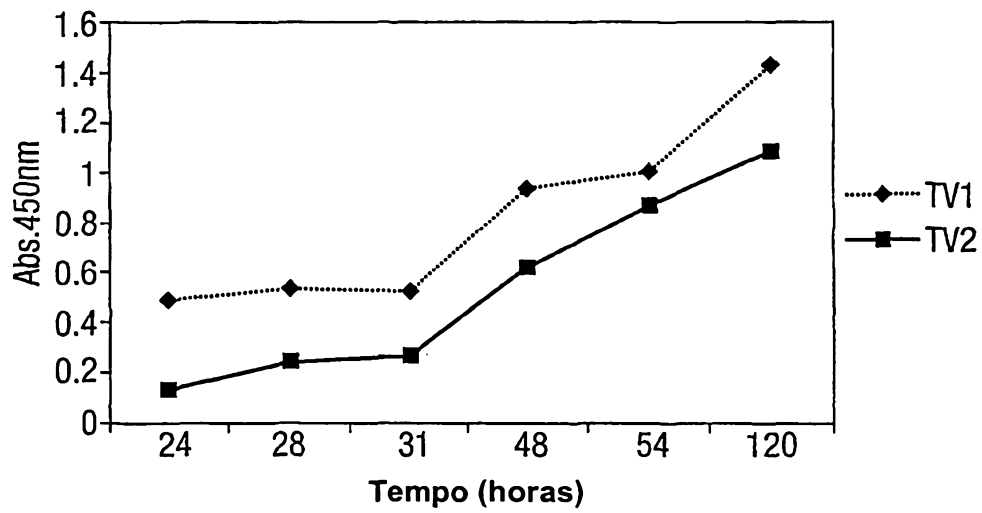


Fig.2b.

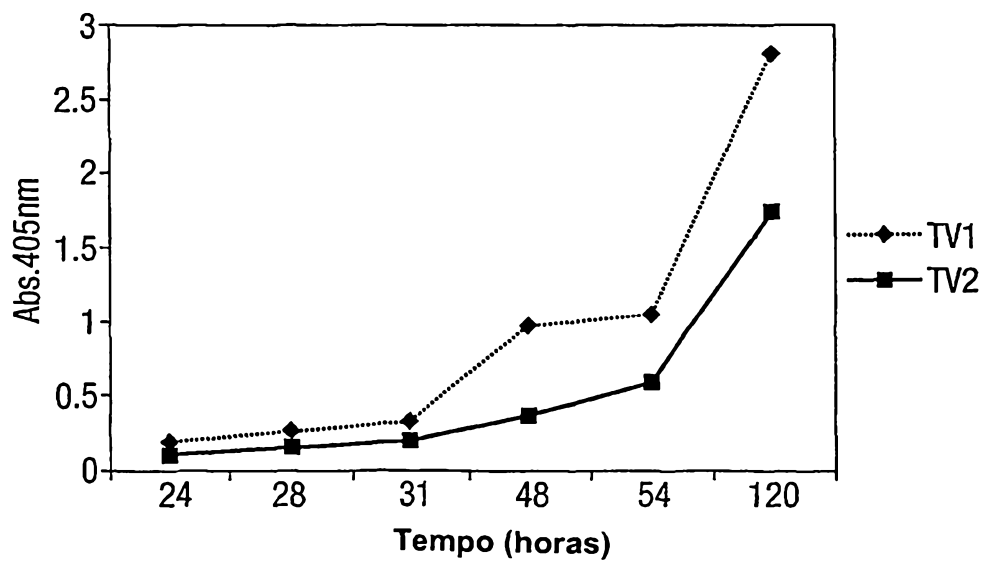


Fig.3.

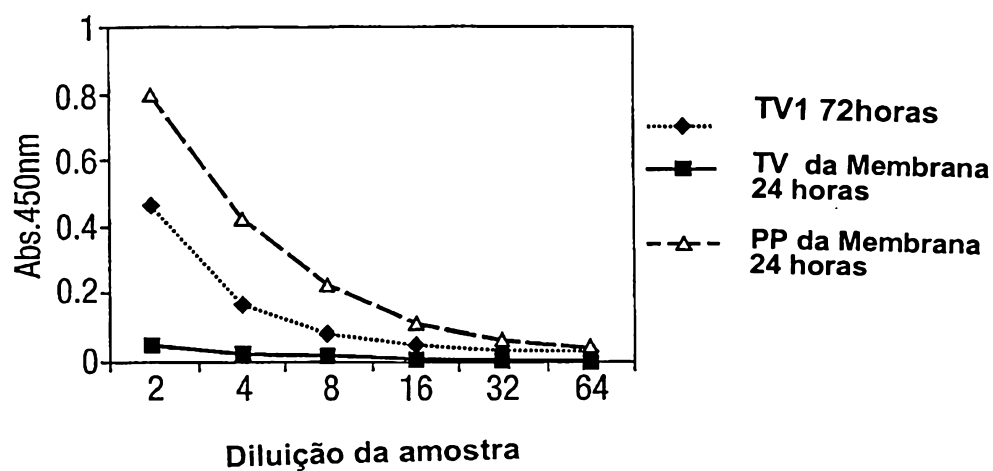


Fig.4.

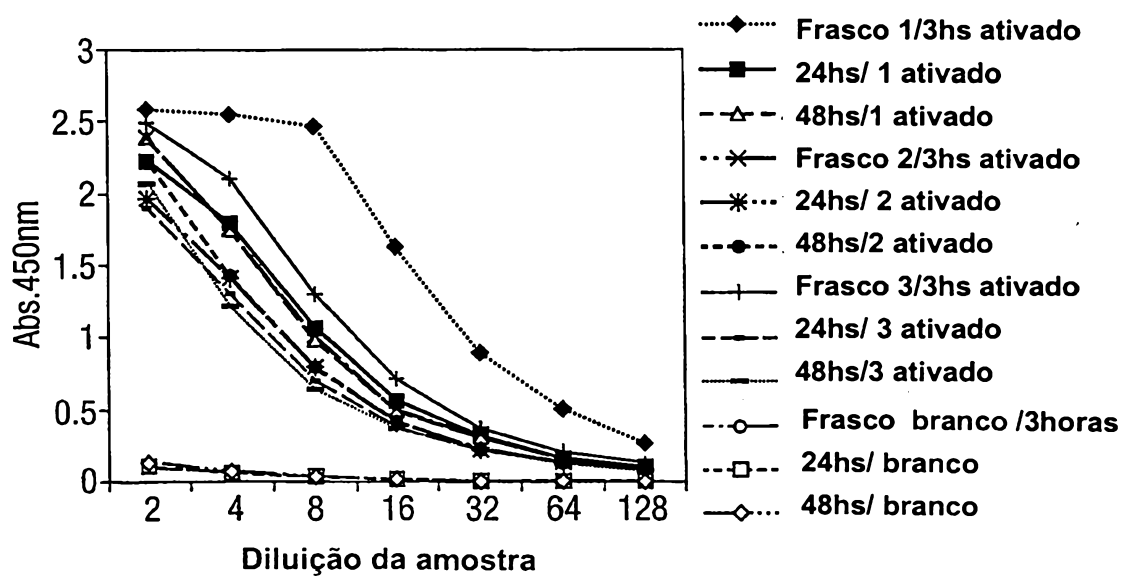


Fig.5.

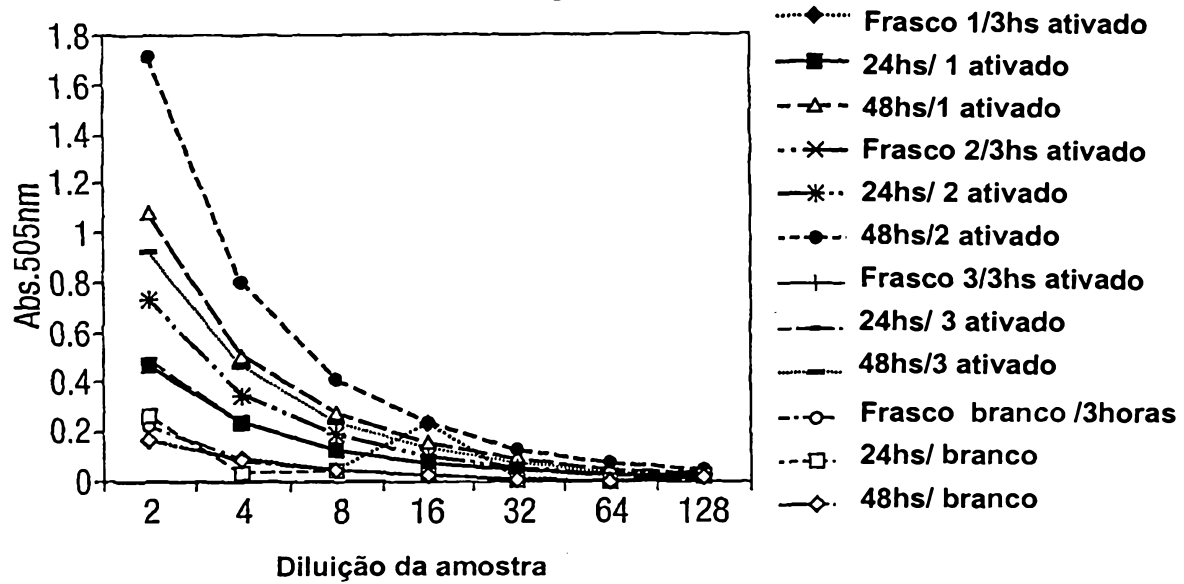
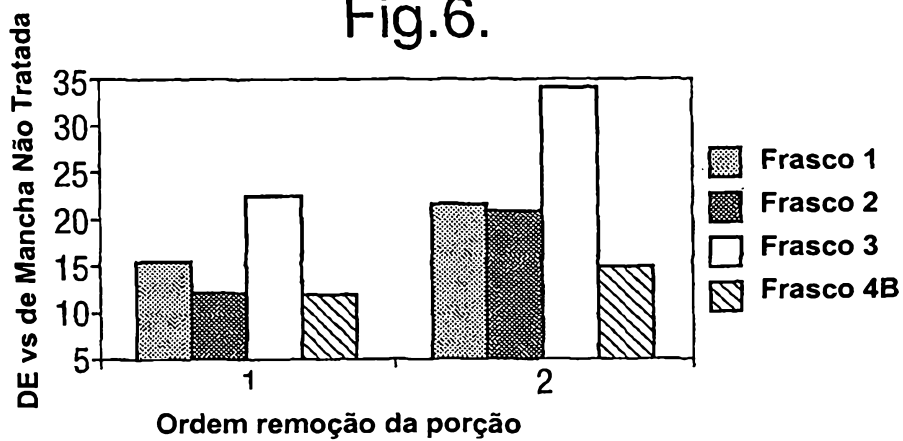


Fig.6.



Resumo

ARTIGO PARA USO EM UM PROCESSO ENZIMÁTICO DE LIMPEZA MANUAL DE TECIDO, KIT DE PARTES E MÉTODO PARA LIMPEZA MANUAL DE TECIDO

Um artigo para uso em um processo enzimático de limpeza de tecido, dito artigo contendo um ou mais tipos de microorganismos inofensivos capazes de excretar enzimas úteis no dito processo de limpeza de tecido. Além disso, é proporcionado um método de limpeza de tecidos pelo qual os tecidos manchados são embebidos com água na presença do dito artigo.