(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 525 012**

(51) Int. CI.:

C09D 5/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10703944 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2393887**

(54) Título: **Composición**

(30) Prioridad:

05.02.2009 US 150125 P
05.02.2009 GB 0901966

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2014

(73) Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (100.0%)
Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K, DK

(72) Inventor/es:

LAURESEN, BRIAN SØGAARD;
KRISTENSEN, JAKOB BROBERG;
BESENBACHER, FLEMMING;
SUTHERLAND, DUNCAN;
SHIPOVSKOV, STEPAN y
KRAGH, KARSTEN MATTHIAS

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Composición

Campo de la invención

Esta invención se refiere a una composición antiincrustación. En particular, esta invención se refiere a una composición que comprende un material de recubrimiento de superficie y una enzima reticulada con un agente multifuncional. La invención también se refiere a un procedimiento para producir la composición y a un método para inhibir la formación de una biopelícula usando la composición.

Descripción de la técnica anterior

La bioincrustación es un problema en cualquier superficie que está de manera constante o intermitente en contacto con agua. La unión y el crecimiento de organismos vivos sobre superficies provocan problemas higiénicos y funcionales en muchos tipos de equipo y dispositivos que van desde implantes médicos y circuitos electrónicos a construcciones más grandes, tales como equipo de procesamiento, fábricas de papel y barcos.

En muchos casos, la bioincrustación consiste en impurezas orgánicas microscópicas o una capa fangosa visible de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que contienen bacterias y otros microorganismos. Esta categoría de bioincrustación se denomina microincrustación, o más comúnmente biopelícula, y se produce en cualquier sitio en entornos tanto naturales como industriales en los que superficies están expuestas al agua. La bioincrustación en entornos marinos también incluye organismos macroscópicos, tales como algas y percebes. Este tipo de bioincrustación es un problema particular para barcos y estructuras sumergidas, tales como tuberías, cables, redes de pesca, los pilares de puentes y plataformas petrolíferas y otras construcciones portuarias o hidrotécnicas. El consumo de combustible de barcos puede aumentar hasta en un 40% debido a la bioincrustación. La figura 1 es una visión general esquemática de la química de componentes estructurales de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) implicadas en biopelículas bacterianas.

En particular, tal como se comenta en el documento US 5071479, el crecimiento de organismos marinos sobre las partes sumergidas del casco de un barco es un problema particular. Tal crecimiento aumenta la resistencia de rozamiento del casco al paso por el agua, lo que conduce a un aumento del consumo de combustible y/o una reducción en la velocidad del barco. Los crecimientos marinos se acumulan tan rápidamente que el remedio de limpieza y nuevo pintado tal como se requiere en dique seco se considera generalmente demasiado caro. Una alternativa, que se ha puesto en práctica con eficacia creciente a lo largo de los años, es limitar la extensión de la incrustación aplicando al casco una pintura de acabado que incorpora agentes antiincrustación. Los agentes antiincrustación pueden ser biocidas que se liberan de la superficie de la pintura a lo largo de un periodo de tiempo a una concentración que es lo suficientemente alta como para inhibir la incrustación por organismos marinos en la superficie del casco.

Previamente, el tributil-estaño (TBT) ha sido un biocida ampliamente usado, particularmente en antiincrustantes marinos. Sin embargo, debido a preocupaciones crecientes sobre los efectos medioambientales provocados por el uso de biocidas de estaño orgánicos a sus niveles comerciales como componente activo antiincrustante en composiciones de recubrimiento para aplicaciones acuáticas (marinas), se ha detenido efectivamente el uso. Se ha mostrado que, debido al uso extendido de compuestos de tipo tributil-estaño en particular, a concentraciones de hasta el 20% en peso en pinturas para fondos de barcos, la contaminación del agua circundante debido a lixiviación ha alcanzado un nivel tal como para producir la degradación de organismos de concha y mejillones. Se han detectado estos efectos a lo largo del litoral franco-británico y se ha confirmado un efecto similar en las aguas estadounidenses y de Extremo Oriente. El Convenio Internacional de la Organización Marítima Internacional (OMI) sobre el control de los sistemas antiincrustantes perjudiciales (Convenio AFS) adoptado en una conferencia diplomática de la OMI en octubre de 2001 prohíbe la aplicación de recubrimientos de TBT en barcos a partir del 1 de enero de 2003 seguido por la eliminación de recubrimientos de TBT activos de barcos, que entró en vigor el 17 de septiembre de 2008.

Actualmente, las pinturas antiincrustación más ampliamente usadas son a base de cobre con biocidas secundarios (Yebra *et al*, 2004. Progress in Organic Coatings 50:75-104). Sin embargo, los biocidas secundarios, por ejemplo, piritiona de cobre o isotiazolona son necesarios para complementar la acción biocida del cobre, que es ineficaz frente a algunas especies de algas extendidas tolerantes al cobre (por ejemplo, *Enteromorpha* spp). Los biocidas secundarios están igualmente bajo sospecha de ser perjudiciales para el medio ambiente. La seguridad de los biocidas secundarios se ha revisado por varios autores (Boxall, 2004. Chemistry Today 22(6):46-8; Karlsson y Eklund, 2004. Marine Pollution Bulletin 2004; 49:456-64; Kobayashi y Okamura, 2002. Marine Pollution Bulletin 2002; 44:748-51; Konstantinou y Albanis, 2004. Environment International 2004; 30:235-48; Ranke y Jastorff, 2002 Fresenius Environmental Bulletin 2002; 11(10a):769-72).

Existe, por tanto, el deseo de proporcionar componentes antiincrustación respetuosos con el medio ambiente. Se sabe a partir de la técnica anterior cómo usar diferentes enzimas en composiciones antiincrustación, tales como, por

ejemplo composiciones de recubrimiento. Sin embargo, el mantenimiento a largo plazo de la actividad en una pintura es un reto significativo puesto que la mayor parte de las enzimas difundirán inherentemente fuera del recubrimiento relativamente rápido una vez que se hidrata. Además, la estabilidad de las enzimas en la pintura húmeda se ve cuestionada por el disolvente en pinturas a base de disolventes orgánicos. La presente invención mitiga estos problemas puesto que los cristales enzimáticos reticulados (CLEC) y los agregados enzimáticos reticulados (CLEA) tienen una estabilidad aumentada en comparación con las enzimas en disolución. Además, las partículas de CLEC y CLEA se conservarán en la pintura debido a su tamaño físico.

En un aspecto la presente invención se proporciona como la reivindicación 1.

En otro aspecto, la presente invención se proporciona como la reivindicación 10.

En otro aspecto, la presente invención se proporciona como la reivindicación 11.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria descriptiva, el término “incrustación” se refiere a la acumulación de material no deseado sobre una superficie. Este material no deseado puede comprender organismos y/o materia no viva (o bien orgánica o bien inorgánica).

En la presente memoria descriptiva, los “incrustantes” a los que se hace referencia mediante los términos “antiincrustante(s)”, “antiincrustación” y “antiincrustantes” incluyen organismos y materia no viva que pueden unirse y/o residir y/o crecer sobre la superficie que se ha tratado con la presente composición. Los organismos incluyen microorganismos tales como bacterias, hongos y protozoos (en particular, bacterias), y organismos tales como algas, plantas y animales (en particular vertebrados, invertebrados, percebes, moluscos, briozoos y poliquetos). El organismo pueden ser organismos marinos.

En la presente memoria descriptiva, una “actividad antiincrustación” se refiere a una actividad del cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado para impedir o reducir la acumulación de material no deseado sobre una superficie. Es decir, para impedir o reducir la cantidad de organismos y materia no viva que pueden unirse y/o residir y/o crecer sobre la superficie que se ha tratado con la presente composición.

En la técnica, el término “biopelícula” se usa generalmente para describir la incrustación que implica sólo microorganismos, mientras que el término “bioincrustación” es más general y se refiere a incrustación con organismos tanto microscópicos como macroscópicos. El término “biopelícula” también se denomina a veces microincrustación, mientras que la incrustación que implica organismos macroscópicos se denomina a veces macroincrustación.

En la presente memoria descriptiva “material de recubrimiento de superficie” se refiere a un material, o compuesto o composición que se adhiere a una superficie para proporcionar un recubrimiento sobre la misma. Se conocen bien materiales de recubrimiento de superficie en el campo de las pinturas.

En la presente memoria descriptiva, “el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado está presente en una cantidad eficaz para reducir o prevenir la incrustación de una superficie recubierta con la composición” puede referirse a un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado que tiene actividad antiincrustación por sí mismo, o a un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado que actúa sobre un sustrato para generar un compuesto antiincrustante, o a un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado que interviene en una reacción acoplada con enzima(s) y/o cristal(es) enzimático(s) reticulado(s) y/o agregado(s) enzimático(s) reticulado(s) y/o sustrato(s) adicionales para generar un compuesto antiincrustante. La capacidad de un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado para actuar como antiincrustante, o de un sistema de enzima/sustrato para generar un antiincrustante puede determinarse usando un ensayo seleccionado de los descritos en el presente documento. En la presente memoria descriptiva, reducción de la incrustación se refiere a una reducción en la cantidad de organismos y materia no viva que pueden unirse y/o residir y/o crecer sobre la superficie que se ha tratado con la presente composición en comparación con una superficie equivalente que no se ha tratado con la composición. Esta reducción en la cantidad de organismos y materia no viva sobre una superficie puede ser de al menos un 1%, al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, en comparación con una superficie equivalente que no se ha tratado. En la presente memoria descriptiva, prevención de la incrustación se refiere a una reducción en la cantidad de organismos y materia no viva que pueden unirse y/o residir y/o crecer sobre la superficie que se ha tratado con la presente composición hasta una cantidad no detectable en comparación con una superficie equivalente que no se ha tratado.

En la presente memoria descriptiva, el término “cristales enzimáticos reticulados” (CLEC) se refiere a una enzima que en primer lugar se cristaliza y posteriormente se reticula con un agente de reticulación multifuncional adecuado.

En la presente memoria descriptiva, el término “agregados enzimáticos reticulados” (CLEA) se refiere a una enzima

que en primer lugar se precipita a partir de una disolución acuosa, proporcionando un agregado físico de moléculas enzimáticas, y posteriormente se reticula con un agente de reticulación multifuncional adecuado. La enzima puede precipitarse usando sales inorgánicas o disolventes orgánicos, por ejemplo usando sulfato de amonio o polietilenglicol.

Composición

Preferiblemente, la composición comprende un cristal enzimático reticulado. Preferiblemente, la composición comprende una pluralidad de los cristales enzimáticos reticulados. Preferiblemente, los cristales enzimáticos reticulados son iguales. En un aspecto adicional, los cristales enzimáticos reticulados comprenden al menos dos tipos diferentes de cristales enzimáticos, comprendiendo cada tipo de cristal enzimático una enzima diferente.

Preferiblemente, la composición comprende un agregado enzimático reticulado. Preferiblemente, la composición comprende una pluralidad de los agregados enzimáticos reticulados. Preferiblemente, los agregados enzimáticos reticulados son iguales. En un aspecto adicional, los agregados enzimáticos reticulados comprenden al menos dos tipos diferentes de agregados enzimáticos, comprendiendo cada tipo de agregado enzimático una enzima diferente.

Preferiblemente, la composición es una pintura a base de aceite. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado se seca antes de añadirse a la pintura a base de aceite. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado se seca por congelación o se seca por pulverización.

Material de recubrimiento de superficie

Puede incorporarse cualquier material de recubrimiento de superficie adecuado en la composición y/o el recubrimiento de la presente invención.

Preferiblemente, el material de recubrimiento de superficie comprende componentes seleccionados de resinas de poli(cloruro de vinilo) en un sistema a base de disolventes, cauchos clorados en un sistema a base de disolventes, resinas acrílicas y resinas de metacrilato en sistemas acuosos o a base de disolventes, sistemas de copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo como dispersiones acuosas o sistemas a base de disolventes, poli(vinil metil éter), copolímeros de butadieno tales como cauchos de butadieno-estireno, cauchos de butadieno-acrilonitrilo y cauchos de butadieno-estireno-acrilonitrilo, aceites secantes tales como aceite de linaza, resinas alquídicas, asfalto, resinas epoxídicas, resinas de uretano, resinas de poliéster, resinas fenólicas, colofonia (natural), derivados de colofonia, colofonia desproporcionada, colofonia parcialmente polimerizada, colofonia hidrogenada, gomorresina, gomorresina desproporcionada, sistemas de aglutinantes en dispersión no acuosa, sistemas de aglutinantes de acrilato sililados, sistemas de aglutinantes de acrilato de metal, derivados y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, el material de recubrimiento de superficie comprende un aglutinante. Preferiblemente, el aglutinante se selecciona de colofonia (natural), derivados de colofonia, colofonia desproporcionada, colofonia parcialmente polimerizada, colofonia hidrogenada, gomorresina, gomorresina desproporcionada, resinas acrílicas, poli(vinil metil éter), terpolímeros de acetato de vinilo-cloruro de vinilo-etileno, sistemas de aglutinantes en dispersión no acuosa, sistemas de aglutinantes de acrilato sililados y sistemas de aglutinantes de acrilato de metal. Tales aglutinantes son de particular interés para composiciones antiincrustación usadas para fines marinos.

SISTEMA DE AGLUTINANTE EN DISPERSIÓN NO ACUOSA

Los términos “resina en dispersión no acuosa” y expresiones similares pretenden significar una estructura de cubierta-núcleo que incluye una resina obtenida dispersando de manera estable un componente particulado de resina de alta polaridad, alto peso molecular (el “componente de núcleo”) en un medio líquido no acuoso en un disolvente de baja polaridad usando un componente de alto peso molecular (el “componente de cubierta”).

La resina en dispersión no acuosa puede prepararse mediante un método en el que un monómero etilénicamente insaturado polimerizable que es soluble en un disolvente de hidrocarburo y que es polimerizable para formar un polímero (el componente de núcleo) que es insoluble en el disolvente de hidrocarburo, se somete a polimerización en dispersión según un método convencional en el disolvente de hidrocarburo en presencia de un componente de cubierta (el estabilizador de dispersión) compuesto por un polímero que se disuelve o se hincha en el disolvente.

La resina del tipo en dispersión no acuosa utilizada puede ser una resina conocida en sí misma; o puede producirse como las resinas conocidas. Tales resinas del tipo en dispersión no acuosa y el método para su preparación se describen, por ejemplo, en los documentos US 3.607.821, US 4.147.688, US 4.493.914 y US 4.960.828, la publicación de patente japonesa n.º 29.551/1973 y la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 177.068/1982. Específicamente, como componente de cubierta que constituye la resina del tipo en dispersión no acuosa, pueden usarse diversas sustancias de alto peso molecular solubles en un disolvente de baja polaridad que se describen, por ejemplo, en el documento US 4.960.828 (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 43374/1989).

Desde el aspecto de la propiedad antiincrustación de la capa de pintura final, pueden usarse componentes de cubierta tales como una resina acrílica o una resina vinílica.

Como componente de núcleo, puede aplicarse generalmente un copolímero de un monómero etilénicamente insaturado que tiene una alta polaridad.

La resina del tipo en dispersión no acuosa puede formarse mediante un método conocido en sí mismo. Ejemplos de los mismos son un método en el que el componente de núcleo y el componente de cubierta se forman previamente mediante copolimerización de bloques o copolimerización de injerto, y entonces se mezclan en un disolvente de baja polaridad y, si se requiere, se hacen reaccionar para formar una dispersión no acuosa (véase la publicación de patente japonesa n.º 29.551/1973), y un método en el que una mezcla de monómeros etilénicamente insaturados, al menos uno de los cuales tiene un grupo de alta polaridad, se copolimeriza en un disolvente que disuelve el monómero etilénicamente insaturado pero que no disuelve un polímero (componente de núcleo) formado a partir del mismo y en presencia de un estabilizador de dispersión que o bien se disuelve o bien se dispersa de manera estable en dicho disolvente, y si se requiere, el copolímero obtenido se hace reaccionar además con dicho estabilizador de dispersión para proporcionar una dispersión no acuosa final (véase la patente estadounidense n.º 3.607.821 (publicación de patente japonesa n.º 48.566/1982), solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 177.068/1982, n.º 270.972/2001, n.º 40.010/2001 y n.º 37.971/2002). En este último método, el estabilizador de dispersión contiene en una molécula el componente soluble en el disolvente de baja polaridad y el componente que tiene afinidad por la resina que está dispersándose, o el estabilizador de dispersión de la composición específica que se disuelve en el disolvente de baja polaridad está presente como componente de cubierta, y el componente que se dispersa como componente de núcleo se forma mediante copolimerización de los monómeros.

En la resina del tipo en dispersión no acuosa de la estructura de cubierta-núcleo usada en esta invención, es importante que al menos el componente de núcleo tenga grupos ácido libres o grupos ácido libres y grupos éster silílico que pueden convertirse en el grupo ácido mediante hidrólisis en agua de mar. Preferiblemente el 5-75% en peso, preferiblemente el 5-60% en peso, preferiblemente el 7-50% en peso, de los monómeros del polímero de núcleo deben portar grupos ácido libres. Como los grupos ácido libres tendrán una influencia directa sobre las propiedades de la formulación de pintura, mientras que los grupos éster silílico sólo tendrán influencia tras la hidrólisis en agua de mar, es importante que no más del 3% en peso de los monómeros del componente de núcleo sean monómeros de éster silílico. Normalmente, no más del 1% en peso de los monómeros del componente de núcleo son monómeros de éster silílico, y con la mayor frecuencia no están presentes grupos éster silílico en el núcleo.

Ejemplos de monómeros de éster silílico son ésteres silílicos de ácido acrílico o metacrílico.

Si se desea, también puede estar contenida una menor proporción de los grupos ácido libres o grupos éster silílico en el componente de cubierta. Sin embargo, se cree que menos del 3% en peso de los monómeros de componente de cubierta son grupos ácido libres o grupos éster silílico.

La expresión “grupo ácido libre” es pretende cubrir el grupo ácido en forma de ácido. Debe entenderse que tales ácido grupos pueden existir temporalmente en forma de sal si está presente un contraión adecuado en la composición o en el entorno. Como ejemplo ilustrativo, se prevé que algunos grupos ácido libres puedan estar presentes en forma de sal de sodio si tales grupos están expuestos a agua salada.

Por tanto, la resina del tipo en dispersión no acuosa tiene preferiblemente un índice de acidez de resina de 15-400 mg de KOH/g, preferiblemente de 15 a 300 mg de KOH/g, preferiblemente de 18 a 300 mg de KOH/g. Si el índice de acidez total de la resina en dispersión no acuosa es inferior a 15 mg de KOH/g, la tasa de pulido de la capa de pintura puede ser demasiado baja y la propiedad antiincrustación será a menudo insatisfactoria. Por otra parte, si el índice de acidez total es superior a 400 mg de KOH/g, la tasa de pulido puede ser demasiado alta, motivo por el cual un problema de resistencia al agua (durabilidad de la capa de pintura en agua de mar) se convierte en un problema. (Cuando el componente de núcleo y/o el componente de cubierta contienen el grupo precursor de ácido, el índice de acidez de resina es uno dado tras convertirse el grupo en el grupo ácido mediante hidrólisis). El “índice de acidez de resina” al que se hace referencia en el presente documento es una cantidad (mg) de KOH consumida para neutralizar 1 g de una resina (contenido en sólidos), que expresa un contenido de un grupo ácido (en el caso del grupo precursor de ácido, un contenido de un grupo ácido formado mediante hidrólisis) de la resina (contenido en sólidos).

Es recomendable que el grupo ácido y/o el grupo precursor de ácido esté contenido en el componente de núcleo de manera que el contenido del mismo sea, como índice de acidez de resina, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% del índice de acidez de resina total de la resina del tipo en dispersión no acuosa.

Si el índice de acidez en el componente de núcleo de la resina en dispersión no acuosa es inferior al 80% del índice de acidez total de la resina del tipo en dispersión no acuosa, es decir el índice de acidez del componente de cubierta es superior al 20% del índice de acidez total, puede haber posibles problemas tal como se describió anteriormente

con respecto a la resistencia al agua y la durabilidad. Además, si la composición de recubrimiento comprende iones metálicos libres, puede producirse un problema con respecto a gelificación si el índice de acidez del componente de cubierta es superior al 20% del índice de acidez total.

Habiéndose dicho esto, normalmente se prefiere que el componente de cubierta sea hidrófobo.

La razón en peso seco del componente de núcleo con respecto al componente de cubierta en la resina del tipo en dispersión no acuosa no está especialmente limitada, pero está normalmente en el intervalo de 90/10 a 10/90, preferiblemente de 80/20 a 25/75, preferiblemente de 60/40 a 25/75.

Además, se cree que la materia seca de la resina en dispersión no acuosa constituye normalmente en el intervalo del 2-30%, preferiblemente del 4-25%, preferiblemente del 5-25%, preferiblemente del 5-20% en peso húmedo de la composición de recubrimiento.

Como disolvente para dispersar la resina en dispersión no acuosa que será un aglutinante, pueden usarse diversos disolventes orgánicos que se usan comúnmente para pinturas sin ninguna restricción particular.

Ejemplos de disolventes en los que se disuelven o dispersan los componentes de la composición de pintura de resina en dispersión no acuosa son alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y alcohol bencílico; mezclas de alcohol/agua tales como mezclas de etanol/agua; hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos y aromáticos tales como alcohol blanco, ciclohexano, tolueno, xileno y disolvente de nafta; cetonas tales como metil etil cetona, acetona, metil isobutil cetona, metil isoamil cetona, diacetona-alcohol y ciclohexanona; alcoholes de éter tales como 2-butoxietanol, monometil éter de propilenglicol, monometil éter de etilenglicol, etil éter y butil-diglicol; ésteres tales como acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de metoxipropilo, acetato de n-butilo y acetato de 2-etoxietilo; hidrocarburos clorados tales como cloruro de metileno, tetracloroetano y tricloroetileno; y mezclas de los mismos.

Disolventes útiles son en particular disolventes de tipo hidrocarburo e incluyen disolventes alifáticos, alicíclicos y aromáticos. En la presente invención, se prefiere emplear un disolvente de hidrocarburo alifático y/o disolvente de hidrocarburo alicíclico, o un disolvente de este tipo en la cantidad mayoritaria.

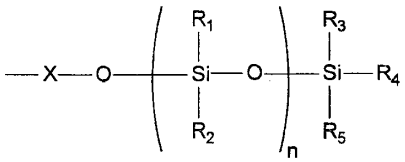
Los disolventes de hidrocarburos alifáticos y alicíclicos adecuados incluyen, por ejemplo, n-hexano, isohexano, n-heptano, n-octano, isooctano, n-decano, n-dodecano, ciclohexano, metilciclohexano y cicloheptano. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, mineral spirit ec, vm&p naphtha y shellzole 72 (fabricados por Shell Chemical Co.); naphtha n.º 3, naphtha n.º 5, naphtha n.º 6 y solvent n.º 7 (fabricados por Exxon Chemical Co.); ip solvent 1016, ip solvent 1620 e ip solvent 2835 (fabricados por Idemitsu Petrochemical co., ltd.); y pengazol an-45 y pengazol 3040 (fabricados por Mobile Oil Co.).

Además, los disolventes aromáticos incluyen, por ejemplo, benceno, tolueno, xileno y decalina. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, Solvesso 100 y Solvesso 150 (fabricados por Exxon Chemical Co.); y Swazol (fabricado por Maruzen Oil Co., Ltd.).

Estos disolventes de tipo hidrocarburo pueden usarse solos o en combinación como una mezcla de dos o más de los mismos.

SISTEMA DE AGLUTINANTE DE ACRILATO SILILADO

En un aspecto adicional, el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento comprende al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal de fórmula general I:

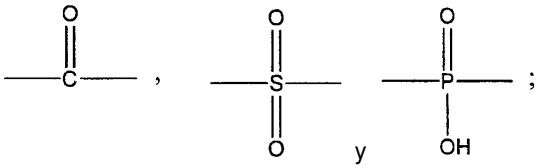


(I)

en la que n es un número entero de 1 o más.

Cuando n es un número entero de 1, 2, 3, 4 o más, se prefiere en estos casos que n sea de hasta aproximadamente 5.000, preferiblemente n es un número entero de desde 1-50, preferiblemente n es un número entero de desde 2-15.

X se selecciona de:



R_1-R_5 son cada uno grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{1-20}, alcoxilo C_{1-20}, fenilo, fenilo opcionalmente sustituido, fenoxilo y fenoxilo opcionalmente sustituido. Con respecto a la fórmula I anterior, se prefiere generalmente que cada uno de los grupos alquilo y alcoxilo tenga hasta aproximadamente 5 átomos de carbono (alquilo C_{1-5}). Los ejemplos ilustrativos de sustituyentes para los grupos fenilo y fenoxilo sustituidos incluyen halógeno, alquilo C_{1-5}, alcoxilo C_{1-5} o alquilcarbonilo C_{1-10}. Tal como se indicó anteriormente, R_1-R_5 pueden ser grupos iguales o diferentes.

Pueden sintetizarse monómeros que comprenden los grupos terminales de fórmula general I anterior tal como se describe en el documento EP 0297505 B1, es decir los monómeros pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante condensación, tal como por ejemplo deshidrocondensación de, por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico o un monoéster de ácido maleico con un compuesto de organosililo que tiene R_3-R_5 en su molécula, tal como un organosiloxano que tiene un grupo monohidroxisilano disustituido en un extremo terminal, un monohidroxisilano trisustituido, un organosiloxano que tiene un grupo hidroximetilo o un grupo metilo halogenado, tal como un grupo clorometilo, en un extremo terminal, o un silano trisustituido.

Tales monómeros pueden copolimerizarse (para obtener el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento según la invención) con un monómero polimerizable de vinilo A. Los ejemplos de monómeros polimerizables de vinilo adecuados incluyen ésteres de metacrilato tales como metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de butilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de metoxietilo; ésteres de acrilato tales como acrilato de etilo, acrilato de butilo, acrilato de 2-etilhexilo y acrilato de 2-hidroxietilo; ésteres del ácido maleico tales como maleato de dimetilo y maleato de dietilo; ésteres del ácido fumárico tales como fumarato de dimetilo y fumarato de dietilo; estireno, viniltolueno, α-metilestireno, cloruro de vinilo, acetato de vinilo, butadieno, acrilamida, acrilonitrilo, ácido metacrílico, ácido acrílico, metacrilato de isobornilo y ácido maleico.

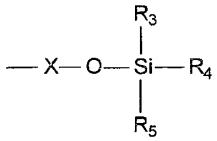
Estos monómeros polimerizables de vinilo (A) actúan como componentes de modificación que confieren propiedades deseables al copolímero resultante. Estos polímeros también son útiles para el fin de obtener polímeros que tienen mayores pesos moleculares que los homopolímeros compuestos por monómeros que comprenden el grupo terminal de fórmula general II y III (a continuación). La cantidad de monómeros polimerizables de vinilo es de no más del 95% en peso del peso total del copolímero resultante, preferiblemente no más del 90% en peso. Por consiguiente, la cantidad de monómeros que comprenden los grupos terminales de fórmula general I anterior es al menos del 5% en peso, en particular al menos del 10% en peso.

Los copolímeros que comprenden al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal de fórmula general I (mostrada anteriormente) pueden formarse polimerizando al menos un monómero que comprende un grupo terminal de fórmula general I con uno o más de los monómeros polimerizables de vinilo (A) anteriores en presencia de un iniciador de la polimerización (de vinilo) adecuado según procedimientos de rutina. Los métodos de polimerización incluyen polimerización en disolución, polimerización en masa, polimerización en emulsión, polimerización en suspensión, polimerización aniónica y polimerización por coordinación. Ejemplos de iniciadores de la polimerización de vinilo adecuados son azocompuestos tales como azobisisobutironitrilo y trifenilmetilazobenceno, y peróxidos tales como peróxido de benzoílo y peróxido de di-*terc*-butilo.

Los copolímeros que van a prepararse mediante los métodos descritos anteriormente tienen preferiblemente pesos moleculares promedio en peso en el intervalo de 1.000-1.500.000, tales como en el intervalo de 5.000-1.500.000, por ejemplo en el intervalo de 5.000-1.000.000, en el intervalo de 5.000-500.000, en el intervalo de 5.000-250.000, o en el intervalo de 5.000-100.000. Si el peso molecular del copolímero es demasiado bajo, es difícil formar una película rígida, uniforme y duradera. Si, por el contrario, el peso molecular del copolímero es demasiado alto, hace que el barniz sea altamente viscoso. Un barniz de una viscosidad tan alta debe diluirse con un disolvente para la formulación de una composición de recubrimiento. Por tanto, el contenido en sólidos de la resina de la composición de recubrimiento se reduce y sólo puede formarse una película seca delgada mediante una única aplicación. Esto es inconveniente porque son necesarias varias aplicaciones de la composición de recubrimiento para lograr el grosor de película seca apropiado.

Aunque el experto en la técnica conocerá varios métodos diferentes para determinar el peso molecular promedio en peso del polímero en cuestión, se prefiere que el peso molecular promedio en peso se determine según el método de CPG descrito en la página 34 del documento WO 97/44401.

En otro aspecto, el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento comprende al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal de fórmula general II:



(II)

en la que X, R_3, R_4 y R_5 son tal como se definen para la fórmula general I.

Ejemplos de monómeros que tiene un grupo terminal de fórmula general II (mostrada anteriormente) son monómeros polimerizables de vinilo con funcionalidad ácido, tales como monómeros derivados de ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido maleico (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico con 1-6 átomos de carbono) o ácido fumárico (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico con 1-6 átomos de carbono).

Con respecto al grupo triorganosililo, es decir el grupo -Si(R_3)(R_4)(R_5), mostrado en las fórmulas anteriores I o II, R_3, R_4 y R_5 pueden ser iguales o diferentes, tales como alquilo C_{1-20} (por ejemplo metilo, etilo, propilo, butilo, cicloalquilo tal como ciclohexilo y ciclohexilo sustituido); arilo (por ejemplo, fenilo y naftilo) o arilo sustituido (por ejemplo, fenilo sustituido y naftilo sustituido). Ejemplos de sustituyentes para arilo, halógeno, alquilo C_{1-18}, acilo C_{1-10}, sulfonilo, nitro o amino.

Por tanto, los ejemplos específicos de un grupo triorganosililo adecuado (es decir el grupo -Si(R_3)(R_4)(R_5)) mostrado en la fórmula general I o II incluyen trimetilsililo, trietilsililo, tri-n-propilsililo, tri-n-butilsililo, tri-*iso*-propilsililo, tri-n-pentilsililo, tri-n-hexilsililo, tri-n-octilsililo, tri-n-dodecilsililo, trifenilsililo, tri-p-metilfenilsililo, tribencilsililo, tri-2-metilisopropilsililo, tri-*terc*-butilsililo, etildimetilsililo, n-butildimetilsililo, di-*iso*-propil-n-butilsililo, n-octil-di-n-butilsililo, di-*iso*-propriloctadecilsililo, diciclohexilfenilsililo, *terc*-butildifenilsililo, dodecildifenilsililo y difenilmetilsililo.

Los ejemplos específicos de monómeros derivados de ácido metacrílico adecuados que portan al menos un grupo terminal de fórmula general I o II incluyen (met)acrilato de trimetilsililo, (met)acrilato de trietil-sililo, (met)acrilato de tri-n-propilsililo, (met)acrilato de triisopropilsililo, (met)acrilato de tri-n-butilsililo, (met)acrilato de triisobutilsililo, (met)acrilato de tri-*terc*-butilsililo, (met)acrilato de tri-n-amilsililo, (met)acrilato de tri-n-hexilsililo, (met)acrilato de tri-n-octilsililo, (met)acrilato de tri-n-dodecilsililo, (met)acrilato de trifenilsililo, (met)acrilato de tri-p-metilfenilsililo, (met)acrilato de tribencilsililo, (met)acrilato de etildimetilsililo, (met)acrilato de n-butildimetilsililo, (met)acrilato de diisopropil-n-butilsililo, (met)acrilato de n-octildi-n-butilsililo, (met)acrilato de diisopropilestearilsililo, (met)acrilato de diciclohexilfenilsililo, (met)acrilato de t-butildifenilsililo y (met)acrilato de laurildifenilsililo.

Los ejemplos específicos de monómeros derivados de ácido maleico y derivados de ácido fumárico adecuados que portan al menos un grupo terminal de fórmula general I o II incluyen maleato de metilo y triisopropilsililo, maleato de amilo y triisopropilsililo, maleato de n-butilo y tri-n-butilsililo, maleato de metilo y *terc*-butildifenilsililo, maleato de n-butilo y t-butildifenilsililo, fumarato de metilo y triisopropilsililo, fumarato de amilo y triisopropilsililo, fumarato de n-butilo y tri-n-butilsililo, fumarato de metilo y *terc*-butildifenilsililo y fumarato de n-butilo y *terc*-butildifenilsililo.

En otro aspecto, el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento comprende unidades monoméricas con un grupo terminal de fórmula general II (tal como se comentó anteriormente) en combinación con un segundo monómero B de fórmula general III:

$$Y\text{-}(CH(R_A)\text{-}CH(R_B)\text{-}O)_p\text{-}Z \qquad (III)$$

en la que Z es un grupo alquilo C_{1-20} o un grupo arilo ; Y es un grupo acriloiloxilo, un grupo metacriloiloxilo, un grupo maleinoiloxilo o un grupo fumaroiloxilo; R_A y R_B se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-20} y arilo; y p es un número entero de 1 a 25.

Si p> 2, R_A y R_B son preferiblemente hidrógeno o CH_3, es decir si p>2 el monómero B se deriva preferiblemente de un polietilenglicol o un polipropilenglicol.

Si p=1 se contempla que los monómeros, en los que R_A y R_B son grupos más grandes, tales como alquilo C_{1-20} o arilo.

Tal como se muestra en la fórmula III, el monómero B tiene en su molécula un grupo acriloiloxilo, un grupo metacriloiloxilo, un grupo maleinoiloxilo (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico C_{1-6}) o un grupo fumaroiloxilo (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico C_{1-6}) como grupo insaturado (Y) y también alcoxi- o ariloxipolietilenglicol. En el grupo alcoxi- o ariloxipolietilenglicol, el grado de polimerización (p) del polietilenglicol es de desde 1 hasta 25.

Los ejemplos del grupo alquilo o arilo (Z) incluyen alquilo C_{1-12} (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, cicloalquilo tal como ciclohexilo y ciclohexilo sustituido); y arilo (por ejemplo, fenilo y naftilo) y arilo sustituido (por ejemplo, fenilo sustituido y naftilo sustituido). Los ejemplos de sustituyentes para arilo incluyen halógeno, grupo alquilo C_{1-18},

alquilcarbonilo C_{1-10}, nitro o amino.

Los ejemplos específicos del monómero B que tiene un grupo (met)acriloiloxilo en una molécula incluyen (met)acrilato de metoxietilo, (met)acrilato de etoxietilo, (met)-acrilato de propoxietilo, (met)acrilato de butoxietilo, (met)acrilato de hexoxietilo, (met)acrilato de metoxidietilenglicol, (met)acrilato de metoxitrietilenglicol, (met)acrilato de etoxidietilenglicol y (met)acrilato de etoxitrietilenglicol.

Los ejemplos específicos del monómero B que tiene un grupo maleinoiloxilo o fumaroiloxilo en una molécula incluyen maleato de n-butilo y metoxietilo, maleato de metilo y etoxidietilenglicol, maleato de metilo y etoxitrietilenglicol, maleato de metilo y propoxidietilenglicol, maleato de metilo y butoxietilo, maleato de metilo y hexoxietilo, fumarato de n-butilo y metoxietilo, fumarato de metilo y etoxidietilenglicol, fumarato de metilo y etoxitrietilenglicol, fumarato de metilo y propoxidietilenglicol, fumarato de metilo y butoxietilo y fumarato de metilo y hexoxietilo.

Tal como entenderá el experto en la técnica, pueden incorporarse otros monómeros vinílicos en el copolímero resultante que comprende o bien unidades monoméricas que tienen un grupo terminal de fórmula general II (mostrada anteriormente) o bien en el copolímero resultante que comprende unidades monoméricas que tienen un grupo terminal de fórmula general II (mostrada anteriormente) en combinación con el segundo monómero B de fórmula III (mostrada anteriormente).

Con respecto a otros monómeros copolimerizables con los monómeros mencionados anteriormente, puede hacerse uso de diversos monómeros vinílicos tales como los monómeros polimerizables de vinilo (A) comentados anteriormente.

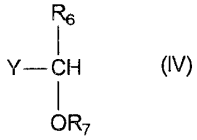
En la mezcla de monómeros, las proporciones del monómero que tiene un grupo terminal de fórmula general II, el monómero B y otro(s) monómero(s) copolimerizable(s) con el mismo (por ejemplo el monómero A) pueden determinarse de manera adecuada dependiendo del uso de la composición de recubrimiento. Sin embargo, en general se prefiere que la proporción del monómero que tiene un grupo terminal de fórmula general II sea del 1-95% en peso, la del monómero B sea del 1-95% en peso y la de otro(s) monómero(s) copolimerizable(s) con el mismo sea del 0-95% en peso basándose en el peso total de los monómeros.

Por tanto, pueden obtenerse copolímeros que comprenden una combinación de unidades monoméricas que portan un grupo terminal de fórmula general II y unidades monoméricas B (y opcionalmente el monómero A) polimerizando tales mezclas de monómeros en presencia de un iniciador de la polimerización de vinilo mediante cualquiera de diversos métodos tales como polimerización en disolución, polimerización en masa, polimerización en emulsión y polimerización en suspensión de manera habitual, que conocerá el experto en la química de polímeros. Sin embargo, se prefiere emplear el método de polimerización en disolución o el método de polimerización en masa.

Los ejemplos de los iniciadores de la polimerización de vinilo incluyen azocompuestos tales como azobis-isobutironitrilo y trifenilmetilazobenceno; y peróxidos tales como peróxido de benzoílo, peróxido de di-*terc*-butilo, peroxibenzoato de *terc*-butilo y peroxiisopropil-carbonato de *terc*-butilo.

El peso molecular del copolímero resultante así obtenido está de manera deseable en el intervalo de 1.000-150.000, preferiblemente en el intervalo de 3.000-100.000, preferiblemente en el intervalo de 5.000-100.000 en cuanto al peso molecular promedio en peso. Pesos moleculares demasiado bajos dan como resultado dificultades en la formación de una película de recubrimiento normal, mientras que pesos moleculares demasiado altos dan como resultado desventajas de que una única operación de recubrimiento sólo proporciona una película de recubrimiento delgada y, de ese modo, deben realizarse operaciones de recubrimiento en un mayor número. Se prefiere regular el contenido en sólidos de la disolución de polímero hasta un valor en el intervalo del 5-90% en peso, de manera deseable del 15-85% en peso.

En un aspecto adicional, el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento comprende unidades monoméricas con un grupo terminal de fórmula general II (tal como se comentó anteriormente) en combinación con un segundo monómero C de fórmula general IV:



(IV)

en la que Y es un grupo acriloiloxilo, un grupo metacriloiloxilo, un grupo maleinoiloxilo o un grupo fumaroiloxilo, y ambos de R_6 y R_7 son alquilo C_{1-12}.

Tal como se muestra en la fórmula IV, el monómero C tiene en su molécula un grupo acriloiloxilo, un grupo metacriloiloxilo, un grupo maleinoiloxilo (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico C_{1-6}) o un grupo

fumaroiloxilo (preferiblemente en forma de un éster monoalquílico C_{1-6}) como grupo insaturado (Y) y también un grupo hemi-acetal.

En el grupo hemi-acetal, los ejemplos de R_6 incluyen alquilo C_{1-12}, preferiblemente alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, isopropilo, isobutilo y *terc*-butilo); y los ejemplos de R_7 incluyen alquilo C_{1-12}, preferiblemente alquilo C_{1-8} (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y *terc*-butilo), y un cicloalquilo C_{5-8} sustituido o no sustituido (por ejemplo, ciclohexilo).

El monómero C puede prepararse mediante una reacción de adición habitual de un monómero vinílico que contiene grupo carboxilo seleccionado de ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido maleico (o monoéster del mismo) y ácido fumárico (o monoéster del mismo), con un alquil vinil éter (por ejemplo, etil vinil éter, propil vinil éter, butil vinil éter, hexil vinil éter y 2-etilhexil vinil éter) o un cicloalquil vinil éter (por ejemplo, ciclohexil vinil éter).

Tal como entenderá el experto en la técnica, pueden incorporarse otros monómeros vinílicos en el copolímero resultante que comprende unidades monoméricas que tienen un grupo terminal de fórmula general II (mostrada anteriormente) en combinación con el segundo monómero C de fórmula IV (mostrada anteriormente).

Con respecto a otros monómeros copolimerizables con los monómeros mencionados anteriormente, puede hacerse uso de diversos monómeros vinílicos tales como los monómeros polimerizables de vinilo (A) comentados anteriormente.

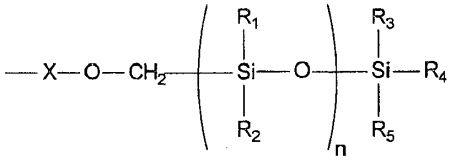
En la mezcla de monómeros, las proporciones del monómero que tiene un grupo terminal de fórmula general II, el monómero C y otro(s) monómero(s) copolimerizable(s) con el mismo (por ejemplo el monómero A) pueden determinarse de manera adecuada dependiendo del uso de la composición de recubrimiento. Sin embargo, en general se prefiere que la proporción del monómero que tiene un grupo terminal de fórmula general II sea del 1-95% en peso (preferiblemente del 1-80% en peso), la del monómero C sea del 1-95% en peso (preferiblemente del 1-80% en peso) y la de otro(s) monómero(s) copolimerizable(s) con el mismo sea de hasta el 98% en peso basándose en el peso total de los monómeros.

Por tanto, pueden obtenerse copolímeros que comprenden una combinación de unidades monoméricas que portan un grupo terminal de fórmula general II y unidades monoméricas C (y opcionalmente el monómero A) polimerizando tales mezclas de monómeros en presencia de un iniciador de la polimerización de vinilo mediante cualquiera de diversos métodos tales como polimerización en disolución, polimerización en masa, polimerización en emulsión y polimerización en suspensión de manera habitual, que conocerá el experto en la química de polímeros. Sin embargo, se prefiere emplear el método de polimerización en disolución o el método de polimerización en masa.

Los ejemplos de los iniciadores de la polimerización de vinilo incluyen azocompuestos tales como azobisisobutironitrilo y trifenilmetilazobenceno; y peróxidos tales como peróxido de benzoílo, peróxido de di-*terc*-butilo, peroxibenzoato de *terc*-butilo y peroxiisopropil-carbonato de *terc*-butilo.

El peso molecular del copolímero resultante así obtenido está de manera deseable en el intervalo de 1.000-150.000, preferiblemente en el intervalo de 3.000-100.000, preferiblemente en el intervalo de 5.000-100.000 en cuanto al peso molecular promedio en peso. Pesos moleculares demasiado bajos dan como resultado dificultades en la formación de una película de recubrimiento normal, mientras que pesos moleculares demasiado altos dan como resultado desventajas de que una única operación de recubrimiento sólo proporciona una película de recubrimiento delgada y, de ese modo, deben realizarse operaciones de recubrimiento en un mayor número.

Aunque se prefiere que la química del copolímero aglutinante sea tal como se describió anteriormente, se contempla que también otros copolímeros que contienen sililo que tienen una estructura ligeramente diferente pueden ser útiles para los fines descritos en el presente documento. Por tanto, un ejemplo de un copolímero aglutinante que tiene una estructura ligeramente diferente en comparación con la química dada a conocer anteriormente es un copolímero aglutinante que comprende al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal de fórmula V:



(V)

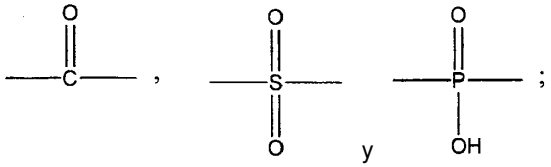
en la que X, n, R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 son tal como se definieron anteriormente en relación con la fórmula general I.

SISTEMA DE AGLUTINANTE DE ACRILATO DE METAL

En otro aspecto, el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento según la invención comprende al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal de fórmula general VI

$$-X\text{-}O\text{-}M\text{-}(L)_n \qquad (VI)$$

en la que X se selecciona de:



en las que n es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula general I.

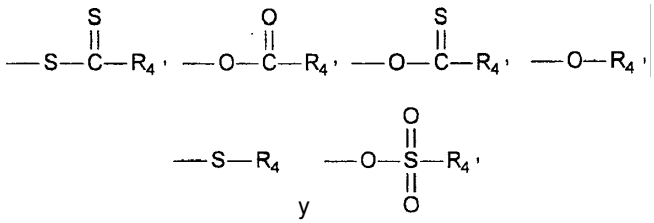
M es un metal. Metal (M) es cualquier metal que tenga una valencia de 2 o más, puede usarse. Los ejemplos específicos de metales adecuados pueden seleccionarse de Ca, Mg, Zn, Cu, Ba, Te, Pb, Fe, Co, Ni, Bi, Si, Ti, Mn, Al y Sn. Ejemplos preferidos son Co, Ni, Cu, Zn, Mn y Te, en particular Cu y Zn. Cuando se sintetiza el copolímero que contiene metal, el metal puede emplearse en forma de su óxido, hidróxido o cloruro. Sin embargo, se contempla que el metal también puede emplearse en forma de otros halogenuros (tales como su sal de fluoruro, yoduro o bromuro) o en forma de su sulfuro o carbonato.

L es un ligando.

Ejemplos de monómeros que tiene un grupo terminal de las fórmulas generales I o II (mostradas anteriormente) son monómeros polimerizables de vinilo con funcionalidad ácido, tales como ácido metacrílico, ácido acrílico, ácido p-estirenosulfónico, ácido 2-metil-2-acrilamida-propanosulfónico, metacrilato de fosfoxipropilo ácido, 3-cloro-2-metacrilato de fosfoxipropilo ácido, metacrilato de fosfoxietilo ácido, ácido itacónico, ácido maleico, anhídrido maleico, itaconato de monoalquilo (por ejemplo metilo, etilo, butilo, 2-etilhexilo), maleato de monoalquilo (por ejemplo metilo, etilo, butilo, 2-etilhexilo; semi-éster de anhídrido de ácido con monómero insaturado polimerizable que contiene hidroxilo (por ejemplo semi-éster de anhídrido succínico, anhídrido maleico o anhídrido ftálico con metacrilato de 2-hidroxietilo.

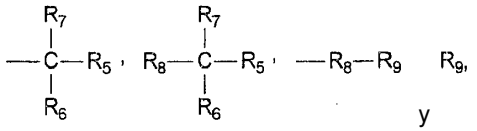
Tal como entenderá el experto en la técnica, y tal como se comenta en detalle a continuación, los monómeros mencionados anteriormente pueden copolimerizarse (para obtener el copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento según la invención) con uno o más monómeros polimerizables de vinilo. Ejemplos de tales monómeros polimerizables de vinilo son acrilato de metilo, metacrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de etilo, acrilato de propilo, metacrilato de propilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de octilo, metacrilato de octilo, acrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de metoxietilo, estireno, viniltolueno, vinilpiridina, vinilpirrolidona, acetato de vinilo, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, itaconato de dimetilo, itaconato de dibutilo, itaconato de di-2-etilhexilo, maleato de dimetilo, maleato de di (2-etilhexilo), etileno, propileno y cloruro de vinilo.

Con respecto al ligando (L), cada ligando individual se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en



en las que R_4 es un residuo orgánico monovalente.

Preferiblemente, R_4 se selecciona del grupo que consiste en

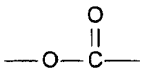


en las que R_5 es hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene desde 1 hasta 20 átomos de carbono; R_6 y R_7 representan cada uno independientemente un grupo hidrocarbonado que tiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono;

R_8 es un grupo hidrocarbonado que tiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono; y R_9 es un grupo hidrocarbonado cíclico que tiene desde 5 hasta 20 átomos de carbono, tal como ácido abiético, ácido palústrico, ácido neoabiético, ácido levopimárico, ácido deshidroabiético, ácido pimárico, ácido isopimárico, ácido sandaracopimárico y ácido Δ8,9-isopimárico.

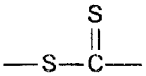
Ejemplos de compuestos que pueden usarse como ligandos (L) son:

(1) Compuestos que comprenden el grupo



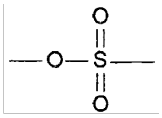
por ejemplo ácidos alifáticos, tales como ácido levulínico; ácidos alicíclicos, tales como ácido nafténico, ácido chaulmúgrico, ácido hidnocarpúsico, ácido neoabiético, ácido levopimárico, ácido palústrico, ácido 2-metil-biciclo-2,2,1-heptano-2-carboxílico; ácidos carboxílicos aromáticos tales como ácido salicílico, ácido cresótico, ácido α-naftoico, ácido β-naftoico, ácido p-oxibenzoico; ácidos alifáticos que contienen halógeno, tales como ácido monocloroacético, ácido monofluoroacético; ácidos aromáticos que contienen halógeno, tales como ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 3,5-diclorobenzoico; ácidos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como ácido quinolincarboxílico, ácido nitrobenzoico, ácido dinitrobenzoico, ácido nitronaftalenocarboxílico; ácidos lactonacarboxílicos, tales como ácido pulvínico, ácido vulpínico; derivados de uracilo, tales como ácido uracil-4-carboxílico, ácido 5-fluoro-uracil-4-carboxílico, ácido uracil-5-carboxílico; ácidos carboxílicos derivados de penicilina, tales como penicilina V, ampicilina, penicilina BT, ácido penicilánico, penicilina G, penicilina O; rifamicina B, lucensomicina, salcomicina, cloranfenicol, variotina, tripacidina; y diversos ácidos grasos sintéticos.

(2) Compuestos que comprenden el grupo



por ejemplo ditiocarbamato de dimetilo y otros ditiocarbamatos.

(3) Compuestos que comprenden el grupo



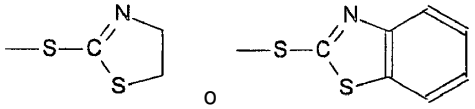
por ejemplo compuestos aromáticos que contienen azufre, tales como ácido 1-naftol-4-sulfónico, ácido p-fenilbencenosulfónico, ácido β-naftalenosulfónico y ácido quinolinsulfónico.

(4) Compuestos que comprenden el grupo

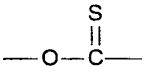
tales como compuestos que comprenden los siguientes grupos

-S-

(5) Compuestos que comprenden el grupo



tales como diversos compuestos tiocarboxílicos.



(6) Compuestos que comprenden el grupo -O- u –OH

por ejemplo fenol, cresol, xilenol, timol, carvacol, eugenol, isoeugenol, fenilfenol, bencilfenol, guayacol,

butilestilbeno, (di)nitrofenol, nitrocresol, salicilato de metilo, salicilato de bencilo, mono-, di-, tri-, tetra- y pentaclorofenol, clorocresol, cloroxilenol, clorotimol, p-cloro-o-ciclo-hexilfenol, p-cloro-o-ciclopentilfenol, p-cloro-o-n-hexilfenol, p-cloro-o-bencilfenol, p-cloro-o-bencil-m-cresol y otros fenoles; β-naftol, 8-hidroxiquinolina.

Aunque no se prefiere en general, también es posible que uno o más o todos los ligandos (L) sean grupos -OH.

El copolímero que va a usarse en la composición de recubrimiento según la invención puede prepararse tal como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0 471 204 B1, EP 0 342 276 B1 o EP 0 204 456 B1, es decir mediante uno de los siguientes métodos:

Un método en el que se prepara en primer lugar un monómero insaturado polimerizable que tiene el enlace éster de metal de ácido orgánico deseado en una parte de extremo, y se copolimeriza con otro(s) monómero(s) insaturado(s) polimerizable(s);

Un método en el que se hace reaccionar un copolímero obtenido mediante la copolimerización de un monómero de ácido orgánico insaturado polimerizable con otro(s) monómero(s) insaturado(s) polimerizable(s) con un ácido orgánico monovalente y un óxido, cloruro o hidróxido de metal o se somete a una reacción de intercambio de éster con un éster de metal de ácido carboxílico monovalente. Más específicamente, el copolímero puede prepararse mediante uno cualquiera de los siguientes métodos:

(1) Una mezcla de:

(a) un óxido, hidróxido, sulfuro o cloruro de metal,

(b) un ácido orgánico monovalente o su sal de metal alcalino, y

(c) un ácido orgánico insaturado polimerizable o su sal de metal alcalino, se calienta con agitación a una temperatura menor que la temperatura de descomposición del producto de éster de metal deseado, y las sustancias subproducto como cloruro de metal alcalino, agua, éster de metal de ácido orgánico monovalente; sal de metal de ácido orgánico insaturado polimerizable bifuncional se retiran para obtener un éster de metal purificado entre el ácido orgánico insaturado polimerizable y el ácido orgánico monovalente.

En la reacción mencionada anteriormente, no siempre es necesario usar cantidades estequiométricas de (a), (b) y (c) y puede usarse, en cuanto a la razón de equivalentes, (a):(b):(c)=1:0,8-3:0,8-2 para obtener el producto deseado. El éster de metal así obtenido entre el ácido orgánico insaturado polimerizable y el ácido orgánico monovalente o la mezcla de dicho éster de metal y el éster de metal orgánico monovalente se somete entonces a una homopolimerización o una copolimerización con otro(s) monómero(s) copolimerizable(s) para proporcionar el copolímero deseado que tiene al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal tal como se muestra en las fórmulas I o II anteriores.

(2) Alternativamente, una mezcla de:

(d) un copolímero que tiene en una cadena lateral un ácido orgánico o su sal de metal alcalino,

(e) un óxido, hidróxido, sulfuro o cloruro de metal, y

(f) un ácido orgánico monovalente, se calienta con agitación a una temperatura menor que la temperatura de descomposición del copolímero que contiene éster de metal deseado, y se retiran las sustancias subproducto, si se desea, para obtener un copolímero que tiene al menos una cadena lateral que porta al menos un grupo terminal tal como se muestra en las fórmulas I o II anteriores.

Con respecto a las razones de los materiales usados en esta reacción, se prefiere usar, en cuanto a la razón de equivalentes, (d):(e):(f)=1:0,8-1,5:0,8-2 y más preferiblemente 1:1,0-1,2:1,0-1,5. Cuando se selecciona un ácido orgánico monovalente de bajo punto de ebullición y la reacción está acompañada por una deshidratación, existe el temor de que se elimine por destilación el ácido orgánico monovalente junto con agua y que se forme un enlace a metal entre las cadenas de polímero, provocando de ese modo un aumento en la viscosidad y gelificación del producto. Por tanto, en este caso particular, se prefiere usar por tanto una mayor cantidad de (f) de lo indicado anteriormente.

(3) Alternativamente, el producto deseado puede prepararse haciendo reaccionar un copolímero que tiene en una cadena lateral un ácido orgánico (g) con un éster de metal de ácido orgánico monovalente (h) a una temperatura no superior a la temperatura de descomposición del producto deseado, efectuando de ese modo una reacción de intercambio de éster entre los materiales usados.

En esta reacción, cuando el ácido orgánico monovalente seleccionado tiene un bajo punto de ebullición (como, por ejemplo, ácido acético), existe el temor de que se formen enlaces éster de metal entre las

cadenas de polímero y, por tanto, la reacción debe controlarse y hacerse avanzar cuidadosamente. Habitualmente, el material (h) se usa en una cantidad de desde 0,3 hasta 3 equivalentes, más preferiblemente de desde 0,4 hasta 2,5 equivalentes, por equivalente de (g).

Los ejemplos de ácidos orgánicos insaturados polimerizables (c) que van a usarse incluyen ácido metacrílico, ácido acrílico, ácido p-estirenosulfónico, ácido 2-metil-2-acrilamida-propanosulfónico, metacrilato de fosfoxipropilo ácido, 3-cloro-2-metacrilato de fosfoxipropilo ácido, metacrilato de fosfoxietilo ácido, ácido itacónico, ácido maleico, anhídrido maleico, itaconato de monoalquilo (por ejemplo metilo, etilo, butilo, 2-etilhexilo), maleato de monoalquilo (por ejemplo metilo, etilo, butilo, 2-etilhexilo; semi-éster de anhídrido de ácido con monómero insaturado polimerizable que contiene hidroxilo (por ejemplo semi-éster de anhídrido succínico, anhídrido maleico o anhídrido ftálico con (met)acrilato de 2-hidroxietilo.

Con respecto al ácido orgánico monovalente (b), puede usarse cualquier ácido orgánico alifático, aromático, alicíclico o heterocíclico. Ejemplos típicos de tales ácidos son: ácido acético, ácido propiónico, ácido levulínico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido láctico, ácido 3,5-diclorobenzoico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido nitrobenzoico, ácido linolénico, ácido ricinoleico, ácido 12-hidroxi-esteárico, ácido fluoroacético, ácido pulvínico, ácido abiético, mercaptobenzotiazol, ácido o-cresótico, ácido naftol-1-carboxílico, ácido p-fenilbencenosulfónico, ácido p-oxibenzoico, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido nafténico, ácido b-naftalenosulfónico, ácido naftol-1-sulfónico, ácido 5-cloro-α,α-bis(3,5-dicloro-2-hidroxifenil)toluenosulfónico, ácido p-fenilbenzoico, ácido p-toluenosulfónico, ácido p-bencenoclorosulfónico, ácido dimetilditiocarbámico, ácido dietilditiocarbámico, ácido dibutilditiocarbámico, ácido litocólico, ácido fenoxiacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido piválico, ácido valérico y diversos ácidos grasos sintéticos.

Con respecto a los otros monómeros insaturados polimerizables mencionados anteriormente, puede usarse cualquier monómero etilénicamente insaturado usado habitualmente. Ejemplos de tales monómeros son acrilato de metilo, metacrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de etilo, acrilato de propilo, metacrilato de propilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de octilo, metacrilato de octilo, acrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de metoxietilo, estireno, viniltolueno, vinilpiridina, vinilpirrolidona, acetato de vinilo, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, itaconato de dimetilo, itaconato de dibutilo, itaconato de di-2-etilhexilo, maleato de dimetilo, maleato de di(2-etilhexilo), etileno, propileno y cloruro de vinilo. Un tipo particular de comonómeros son ésteres acrílicos o metacrílicos en los que el residuo de alcohol incluye un radical hidrocarbonado voluminoso o un segmento blando, por ejemplo un éster alquílico ramificado que tiene 4 o más átomos de carbono o un éster cicloalquílico que tiene 6 o más átomos, un monoacrilato o monometacrilato de polialquilenglicol que tiene opcionalmente un grupo alquil éter terminal o un aducto de acrilato o metacrilato de de 2-hidroxietilo con caprolactona, por ejemplo tal como se describe en el documento EP 0779304 A1.

Si se desea, también pueden usarse monómeros que contienen hidroxilo, tales como acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilato de 2-hidroxipropilo, metacrilato de 2-hidroxipropilo.

Con respecto a los polímeros (d) y (g) que tienen un grupo de ácido orgánico en la cadena lateral, se hace mención de ácidos orgánicos que portan resinas vinílicas, resinas de poliéster, resinas alquídicas modificadas con aceites, resinas alquídicas modificadas con ácidos grasos y/o resinas epoxídicas.

Debe observarse que, en el copolímero resultante, no es necesario que todos los grupos laterales de ácido orgánico contengan un enlace éster de metal; algunos de los grupos laterales de ácido orgánico pueden dejarse sin reaccionar en forma de ácido libre, si se desea.

El peso molecular promedio en peso del copolímero que contiene metal está generalmente en el intervalo de desde 1.000 hasta 150.000, tal como en el intervalo de desde 3.000 hasta 100.000, preferiblemente en el intervalo de desde 5.000 hasta 60.000.

Aunque el experto en la técnica conocerá varios métodos diferentes para determinar el peso molecular promedio en peso del polímero en cuestión, se prefiere que el peso molecular promedio en peso se determine según el método de CPG descrito en la página 34 del documento WO 97/44401.

En otra realización interesante de la invención, la composición de recubrimiento comprende además una cantidad de un ligando orgánico al menos igual a la razón de coordinación de ligando con respecto a metal de 1:1, seleccionándose dicho ligando orgánico del grupo que consiste en nitrocompuestos aromáticos, nitrilos, compuestos de urea, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y compuestos de azufre orgánicos, mediante lo cual el copolímero definido anteriormente forma un complejo de polímero con el ligando orgánico *in situ*.

Por tanto, si el copolímero definido anteriormente se considera como una sal híbrida entonces, mediante la coordinación de un ligando orgánico a cada átomo de metal, se retrasa significativamente la asociación iónica de la sal híbrida para que tenga una menor viscosidad en una disolución en comparación con la disolución correspondiente que no contiene el ligando orgánico. Además, pueden encontrarse mejoras tanto en la liberación sostenida de iones metálicos como en la tasa de consumo de la película. Otra importante ventaja es el hecho de que

la sal híbrida compleja ya no es reactiva con agentes antiincrustación y pigmentos convencionales tales como óxido cuproso, óxido de zinc y similares. Por tanto, la composición de recubrimiento de la presente invención es compatible con los agentes antiincrustación y pigmentos convencionales.

Los ejemplos de ácidos orgánicos monobásicos que pueden utilizarse para formar la sal híbrida incluyen ácidos monocarboxílicos tales como ácido acético, propiónico, butírico, láurico, esteárico, linoleico, oleico, nafténico, cloroacético, fluoroacético, abiético, fenoxiacético, valérico, diclorofenoxiacético, benzoico o naftoico; y ácidos monosulfónicos tales como ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido dodecilbencenosulfónico, naftalenosulfónico o ácido p-fenilbencenosulfónico.

Un método preferido para producir la sal híbrida polimérica se ha dado a conocer en la patente japonesa Kokai n.º 16809/1989. Según este método, se hacen reaccionar copolímeros que contienen grupos ácido colgantes con una sal de metal de un ácido orgánico monobásico de bajo punto de ebullición y un ácido orgánico monobásico de alto punto de ebullición simultáneamente para formar una sal híbrida en la que tanto el anión de ácido colgante de polímero como el anión de ácido monobásico de alto punto de ebullición se unen al mismo catión metálico. Por ejemplo, puede obtenerse una sal de cobre híbrida con el ácido polimérico y puede obtenerse ácido nafténico haciendo reaccionar el ácido polimérico con acetato cúprico y ácido nafténico.

Las sales híbridas de polímero así producidas adoptan una forma pseudorreticulada debido a asociación iónica y, por tanto, tienen una viscosidad relativamente alta en disoluciones. Sin embargo, puede disminuirse significativamente la viscosidad mediante la coordinación de un ligando adicional a la sal híbrida tal como se describe en el presente documento. El complejo de polímero resultante así formado también presenta una tasa relativamente constante tanto en la liberación de metal como en el consumo de la película cuando se aplica como película de recubrimiento antiincrustación.

Los ligandos orgánicos usados para este fin se seleccionan del grupo que consiste en nitrocompuestos aromáticos, compuestos de urea, nitrilos, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y compuestos de azufre orgánicos. Los ligandos orgánicos no se limitan a ligandos unidentados sino que también incluyen ligandos polidentados que contienen una pluralidad de átomos de ligado idénticos o diferentes en la molécula del ligando.

Los ejemplos específicos de tales ligandos incluyen nitrocompuestos aromáticos tales como nitrobenceno; nitrilos tales como isoftalonitrilo; compuestos de urea tales como urea, tiourea, N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxi-N'-metilurea o N-(3,4-diclorofenil)-N',N'-dimetilurea; alcoholes tales como butanol, octanol o geraniol; fenoles tales como hidroquinona, monometil éter de hidroquinona, nonilfenol o BHT; aldehídos tales como acetaldehído o propionaldehído; cetonas tales como acetilacetona, acetofenona o 2-amino-3-cloro-1,4-naftoquina; ácidos carboxílicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico o glicina; y compuestos de azufre tales como tiofeno y su derivados, p-toluenosulfonato de n-propilo, mercaptobenzotiazol, ditiocarbamato de dimetilo o isotiocianato de benceno. Algunos de estos ligandos pueden usarse para fines antiincrustación en composiciones de recubrimiento antiincrustación convencionales.

La cantidad de ligando orgánico para complejar la sal híbrida de polímero debe ser al menos igual a la razón de coordinación de ligando con respecto a metal de 1:1. El máximo será una cantidad tal como para saturar el número de coordinación de un metal particular usado. Por ejemplo, cuando se usa una especie metálica que tiene un número de coordinación de 4, pueden coordinarse uno o dos moles de ligandos unidentados o un mol de ligando bidentado al átomo de metal.

Los ligandos orgánicos se incorporan a una disolución o barniz de la sal híbrida de polímero para formar un complejo de polímero *in situ*. La presencia de cantidades excesivas de los ligandos orgánicos puede tolerarse a menos que las películas de recubrimiento se vean afectadas adversamente tal como la aparición de grietas o ampollas cuando se empapan en solución salina. El copolímero complejado puede tener un contenido en metal de desde el 0,3 hasta el 20%, preferiblemente desde el 0,5 hasta el 15% en peso.

Ejemplos de tales componentes aglutinantes adicionales son: aceites tales como aceite de linaza y derivados del mismo, aceite de ricino y derivados del mismo, aceite de soja y derivados del mismo; y otros componentes aglutinantes poliméricos tales como resinas saturadas de poliéster; poli(acetato de vinilo), poli(butirato de vinilo), poli(cloruro-acetato de vinilo), copolímeros de acetato de vinilo y vinil isobutil éter; cloruro de vinilo; copolímeros de cloruro de vinilo y vinil isobutil éter; resinas alquídicas o resinas alquídicas modificadas; resinas de hidrocarburo tales como condensados de fracciones del petróleo; poliolefinas cloradas tales como caucho clorado, polietileno clorado, polipropileno clorado; copolímeros de estireno tales como copolímeros de estireno/butadieno, copolímeros de estireno/metacrilato y estireno/acrilato; resinas acrílicas tales como homopolímeros y copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de n-butilo, metacrilato de isobutilo y metacrilato de isobutilo; copolímeros de hidroxi-acrilato; resinas de poliamida tales como poliamida a base de ácidos grasos dimerizados, tales como ácidos grasos de aceite de bogol dimerizados; cauchos ciclados; epoxiésteres; epoxiuretanos; poliuretanos; polímeros epoxídicos; resinas de hidroxi-poliéter; resinas de poliamina; etc., así como copolímeros de los mismos.

Debe entenderse que el grupo de otros componentes aglutinantes poliméricos puede incluir flexibilizadores

poliméricos tales como los definidos de manera general y específicamente en el documento WO 97/44401 que se incorpora como referencia al presente documento.

La materia seca de tales componentes aglutinantes adicionales es normalmente del 0-10% en peso húmedo.

Agente de reticulación multifuncional.

El agente de reticulación multifuncional es quitosano o comprende la siguiente estructura:

A-L-B

en la que A y B son grupos funcionales tal como se describe en el presente documento y L es un grupo de unión. En una realización preferida A y B son iguales. El grupo de unión se selecciona de alquileno y dextrano. El grupo alquileno puede ser grupo alquilo lineal [por ejemplo $-(CH_2)_3-$] o ramificado [por ejemplo $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$] y puede contener hasta 10 átomos de carbono. Los grupos alquileno preferidos contienen hasta 6 átomos de carbono. Preferiblemente, los grupos alquilo contienen hasta 5 átomos de carbono. Más preferiblemente, los grupos alquilo contienen hasta 4 átomos de carbono. Grupos alquilo preferidos son metileno, etileno, propileno, butileno.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional comprende dos de los mismos grupos funcionales. El agente de reticulación multifuncional comprende dos grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído, imida, cianato, isocianato.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional comprende dos grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído e isocianato.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional se selecciona de glutaraldehído, glioxal, polialdehído de dextrano, diisocianatos, 2,3-pentadiona, 2,4-pentadiona, 2,4-hexadiona, 3,4-hexediona, 3-metil-2,4-pentadiona, 3-etil-2,4-pentadiona poliazetidina y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional comprende dos grupos funcionales seleccionados de alcohol y aldehído.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional comprende dos grupos funcionales aldehído.

Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional es glutaraldehído. Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional es quitosano.

Cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado.

Los cristales enzimáticos reticulados (también conocidos como CLEC) o los agregados enzimáticos reticulados (también conocidos como CLEA) comprenden un cristal enzimático o un agregado enzimático que se reticula con un agente de reticulación multifuncional.

En general, el tamaño de partícula de los CLEC y CLEA es lo suficientemente pequeño de modo que no interfiere con las propiedades de la pintura (es decir pulido y lisura). Preferiblemente, el tamaño de las partículas es menor de 75 micrómetros, más preferiblemente menor de 60 micrómetros, más preferiblemente menor de 40 micrómetros, más preferiblemente menor de 30 micrómetros, lo más preferiblemente menor de 20 micrómetros.

El intervalo de tamaño de partícula de los CLEC y CLEA es preferiblemente de desde 0,1 micrómetros hasta 75 micrómetros, más preferiblemente desde 0,2 micrómetros hasta 60 micrómetros, más preferiblemente desde 0,5 micrómetros hasta 40 micrómetros, más preferiblemente desde 1,0 micrómetros hasta 30 micrómetros, lo más preferiblemente desde 2,0 micrómetros hasta 20 micrómetros.

Los CLEC y CLEA pueden triturarse hasta alcanzar este tamaño.

Preferiblemente, la enzima se selecciona de hidrolasas, oxidorreductasas, transferasas, liasas e isomerasas.

Preferiblemente, la enzima se selecciona de una proteasa, hexosa oxidasa, glucosa oxidasa y alcohol deshidrogenasa (ADH).

Los CLEC y CLEA preferidos pueden pertenecer a los tipos de enzima descritos a continuación. Enzimas que tienen actividad antiincrustación por sí mismas, o producen un compuesto antiincrustación al actuar sobre un sustrato, o son parte de una reacción acoplada que produce un compuesto antiincrustación son elecciones preferidas. La lista 1 proporciona una lista de tipos de enzima que se ha mostrado o postulado que tienen un efecto antiincrustación o producen un compuesto antiincrustación (Kristensen *et al* 2008, Biotechnology Advances 26, 471-481).

Lista 1: Enzimas que se ha mostrado o postulado que tienen actividad antiincrustación

Número EC	Enzima
1	**Oxidorreductasas**
1.1.3	Oxígeno como aceptor, oxidasas
1.3	Que actúa sobre el grupo CH-CH de donadores
1.10.3	Que actúa sobre difenoles y sustancias relacionadas como donadores, oxígeno como aceptor
1.11.1	Peroxidasas
2	**Transferasas**
2.6.1	Transaminasa
3	**Hidrolasas**
3.1	Esterasas
3.1.1	Que actúa sobre ésteres carboxílicos
3.1.3	Monoéster fosfórico hidrolasas, las fosfatasas
3.2	Glicosilasas
3.2.1	Que hidroliza compuestos de *O*- o *S*-glicosilo
3.4.11	Aminopeptidasa
3.4.17	Carboxipeptidasa
3.4.21-25/3.4.99	Endopeptidasa, proteasa
3.4.21	Serina-endopeptidasa
3.4.22	Cisteína-endopeptidasa
3.4.24	Metaloendopeptidasa
3.5.1	Acilasas. Que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno, distintos de enlaces peptídicos, en amidas lineales
4	**Liasas**
4.2.2	Carbono-oxígeno liasas que actúan sobre polisacáridos
5	**Isomerasas**
6	**Ligasas**

Preferiblemente, la enzima es una lipasa. Preferiblemente, la lipasa se selecciona de isoforma A de lipasa de *Candida antarctica* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), isoforma B de lipasa de *Candida antarctica* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), lipasa de *Candida rugosa* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3) y lipasa de *Rhizomucor miehei* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3).

Muchas de estas lipasas están disponibles comercialmente como agregados enzimáticos reticulados (CLEA). Preferiblemente, el CLEA se selecciona de CLEA de lipasa, más preferiblemente CLEA de isoforma A de lipasa de *Candida antarctica* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), CLEA de isoforma B de lipasa de *Candida antarctica* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), CLEA de lipasa de *Candida rugosa* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3), CLEA de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3) o CLEA de lipasa de *Rhizomucor miehei* (lipasa, triacilglicerol hidrolasa, EC 3.1.1.3).

Preferiblemente, la enzima es una esterasa. Preferiblemente, la esterasa se selecciona de esterasa BS2 de *Bacillus subtilis* (esterasa, éster carboxílico hidrolasa, EC 3.1.1.3) o esterasa BS3 de *Bacillus subtilis* (esterasa, éster carboxílico hidrolasa, EC 3.1.1.3).

También preferiblemente los CLEA son CLEA de esterasa, más preferiblemente CLEA de esterasa BS2 de *Bacillus subtilis* (esterasa, éster carboxílico hidrolasa, EC 3.1.1.3) o CLEA de esterasa BS3 de *Bacillus subtilis* (esterasa, éster carboxílico hidrolasa, EC 3.1.1.3).

Varios CLEA están disponibles comercialmente de, por ejemplo, CLEA technologies (Julianalaan, Delft, Países Bajos).

Preferiblemente, la enzima es una proteasa. Preferiblemente, la proteasa es una serina proteasa. Preferiblemente, la proteasa es una subtilisina. Preferiblemente, la proteasa se selecciona de alcalasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62), savinasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62), esperasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62), papaína (cisteína proteasa, EC 3.4.22.2), serina endoproteasa bacteriana modificada genéticamente, serina proteasa derivada de una cepa modificada genéticamente de *Bacillus subtilis*, serina proteasa (EC 3.4.21.62) derivada de *Bacillus licheniformis* y mananasa (EC 3.2.1.78). Preferiblemente, la enzima es una serina proteasa seleccionada de las obtenidas o que puede obtenerse a partir de *B. subtilis, B. lentus, B. licheniformis* y *B. clausii.* Más preferiblemente, la enzima es una proteasa obtenida o que puede obtenerse a partir de *B. licheniformis.*

Preferiblemente, los CLEA son CLEA de proteasa, más preferiblemente de subtilisina.

Preferiblemente, los CLEA de proteasas se seleccionan de CLEA de alcalasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62), CLEA de savinasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62), CLEA de esperasa (subtilisina, serina endoproteasa EC 3.4.21.62) o CLEA de papaína (cisteína proteasa, EC 3.4.22.2).

Muchas de estos productos de proteasa están disponibles comercialmente de Genencor, por ejemplo: Properase 1600L (serina endoproteasa bacteriana modificada genéticamente), Purafect 4000L (serina proteasa derivada de una cepa modificada genéticamente de *Bacillus subtilis*), Protex 6L (serina proteasa (EC 3.4.21.62) derivada de *Bacillus licheniformis*) y Mannastar (mananasa EC 3.2.1.78)

Otros enzimas preferidas son oxidorreductasas, más preferiblemente hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5) y glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4).

Preferiblemente, oxidorreductasas son peroxidasa pertenecientes al grupo de clasificación EC 1.11.1, cualquier lacasa perteneciente a EC 1.10.3.2, cualquier catecol oxidasa perteneciente a EC 1.10.3.1, cualquier bilirrubina oxidasa perteneciente a EC 1.3.3.5 o cualquier monofenol monooxigenasa perteneciente a EC 1.14.99.1 o cualquier oxidasa perteneciente a EC 1.3.3.

Preferiblemente, la enzima es una haloperoxidasa. Haloperoxidasas preferidas son vanadio cloroperoxidasa, incluso más preferiblemente el mutante P395D / L241 V / T343A de vanadio cloroperoxidasa de *C. inaequalis* (Renirie *et al*, Journal of Applied Microbiology 105 (2008) 264-270).

LACASA Y ENZIMAS RELACIONADAS CON LACASA

Enzimas lacasa y/o enzimas relacionadas con lacasa preferidas son enzimas de origen microbiano. Las enzimas pueden derivarse de plantas, bacterias u hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras).

Los ejemplos adecuados a partir de hongos incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii* y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Poliprous*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radita* (documento WO 92/01046) o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (documento JP 2-238885).

Los ejemplos adecuados de bacterias incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Bacillus*.

Se prefiere una lacasa derivada de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Poliporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctinia*; en particular una lacasa derivada de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Poliporus pinsitus*, *Scytalidium thermophilum* o *Rhizoctonia solani*.

La lacasa o la enzima relacionada con lacasa puede ser además una que puede producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante que porta una secuencia de ADN que codifica para dicha lacasa así como secuencias de ADN que codifican para funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN que codifica para la lacasa, en un medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión de la enzima lacasa, y recuperar la lacasa del cultivo.

Hidrolasas preferidas son arilesterasa (aril-éster hidrolasa EC 3.1.1.2) disponible comercialmente de Genencor como PrimaGreen™.

Preferiblemente, la enzima es alcohol deshidrogenasa (ADH). Se prefieren enzimas ADH de origen bacteriano, especialmente ADH de *Pseudogluconobacter saccharoketogenos*, ADH de *Lactobacillus kefir*, ADH de *Thermoanaerobium brockii* y aldosa azúcar deshidrogenasa (ASD) de *Escherichia coli*.

La actividad de algunas enzimas ADH depende de la presencia de un cofactor redox. Tales enzimas ADH se denominan en esta memoria descriptiva “alcohol deshidrogenasas dependientes de cofactor redox” y pueden usarse en la composición.

Cuando se usan alcohol deshidrogenasas dependientes de cofactor redox en la composición, la composición comprende además un cofactor redox. Preferiblemente, el cofactor redox se selecciona de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$) y un cofactor de quinina. Preferiblemente, el cofactor de quinona se selecciona de pirroloquinolina-quinona (PQQ), triptofil-triptofanquinona (TTQ), topaquinona (TPQ) y lisina-tirosilquinona (LTQ).

Preferiblemente, la ADH se selecciona de una ADH dependiente de cofactor redox de quinona y una ADH dependiente de cofactor redox de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$).

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de cofactor redox de quinona o $NAD^+/NADP^+$ pueden inhibir o reducir la formación de biopelícula (incrustación), particularmente biopelícula bacteriana.

Algunas alcohol deshidrogenasas, especialmente ADH que se encuentran dentro de la clase de enzimas (E.C.) 1.1.1, particularmente E.C. 1.1.1.1 o E.C. 1.1.1.2, así como las que se encuentran dentro de la clase de enzimas (E.C.) 1.2.1, funcionan generalmente junto con el cofactor redox nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$), avanzando la reacción con la reducción de NAD^+ o $NADP^+$ para dar NADH o NADPH, respectivamente.

Otras alcohol deshidrogenasas, especialmente las que se encuentran dentro de la clase de enzimas EC 1.1.5, particularmente EC 1.1.5.2, funcionan generalmente junto con un cofactor redox de quinona, particularmente un cofactor de quinona seleccionado de pirroloquinolina-quinona (PQQ), triptofil-triptofanquinona (TTQ), topaquinona (TPQ) y lisina-tirosilquinona (LTQ), reduciéndose el grupo quinona para dar un grupo di- o tetrahidroquinona durante la reacción.

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de cofactor de NAD^+ / $NADP^+$ o cofactor de quinona son enzimas ADH que funcionan junto con un cofactor redox seleccionado de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$) o un cofactor de quinona, particularmente un cofactor de quinona seleccionado de pirroloquinolina-quinona (PQQ), triptofil-triptofanquinona (TTQ), topaquinona (TPQ) y lisina-tirosilquinona (LTQ).

Preferiblemente, la ADH se selecciona de la clase de enzimas (E.C.) 1.1, especialmente de la subclase 1.1.1 ó 1.1.5. De las enzimas ADH en la subclase 1.1.1, se prefieren aquéllas en la clasificación 1.1.1.1 ó 1.1.1.2. De las enzimas ADH en la subclase 1.1.5, se prefieren aquéllas en la clasificación 1.1.5.2.

En otra realización, la ADH se selecciona de las aldehído reductasas de la clase de enzimas (E.C.) 1.2.1. Estas enzimas catalizan la reacción opuesta de las ADH y se sabe que muchas enzimas pueden funcionar como catalizador para tanto la reacción directa como la inversa dependiendo de las condiciones.

En un aspecto adicional, los cristales enzimáticos reticulados o los agregados enzimáticos reticulados comprenden cristales o agregados de subtilisina reticulados con quitosano.

Características adicionales de la composición

La composición es una composición antiincrustación.

En un aspecto adicional, la composición comprende además un sustrato en el que el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado genera un compuesto antiincrustante cuando actúa sobre el sustrato. Un compuesto antiincrustación preferido es peróxido de hidrógeno.

Preferiblemente, el sustrato/cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende una combinación de sustrato/enzima que se selecciona de glucosa/hexosa oxidasa, glucosa/glucosa oxidasa, L-aminoácido/L-aminoácido oxidasa, galactosa/galactosa oxidasa, lactosa/β-galactosidasa/hexosa oxidasa, lactosa/β-galactosidasa/glucosa oxidasa, 2-desoxiglucosa/glucosa oxidasa, piranosa/piranosa oxidasa, y mezclas de los mismos. Claramente, la enzima de estas combinaciones de sustrato/enzima se reticula antes de usarse en la composición.

En un aspecto adicional, la composición comprende además una primera enzima y un primer sustrato, en la que la acción de la primera enzima sobre el primer sustrato proporciona un segundo sustrato; y en la que el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado genera un compuesto antiincrustante cuando actúa sobre el segundo sustrato.

Primera enzima

Preferiblemente, la primera enzima se selecciona de enzimas de acción exo que pueden degradar sustratos oligoméricos o poliméricos para dar unidades monoméricas, por ejemplo β-galactosidasa, peptidasa; glucoamilasa, y

mezclas de las mismas.

Preferiblemente, la primera enzima es glucoamilasa (EC 3.2.1.3). Un experto en la técnica apreciará que la glucoamilasa también se conoce como amiloglucosidasa.

Preferiblemente, la primera enzima es glucoamilasa de *Trichoderma reesei* o glucoamilasa de *Humicola grisea.* Preferiblemente, la primera enzima es glucoamilasa de *Trichoderma reesei.* Preferiblemente, la primera enzima es glucoamilasa de *Trichoderma reesei* preparada tal como se describe en el documento US 2006/0094080. Preferiblemente, la primera enzima es glucoamilasa de *Humicola grisea.*

Preferiblemente, la primera enzima se reticula con un agente de reticulación multifuncional.

Primer sustrato

La provisión de un primer sustrato es ventajosa porque proporciona liberación sostenida y/o prolongada del segundo sustrato mediante la acción de la primera enzima sobre el primer sustrato.

Preferiblemente, el primer sustrato se selecciona de oligómeros y polímeros de sustratos para enzimas oxidativas, almidón, lactosa, celulosa, dextrosa, péptido, inulina, y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, el primer sustrato es almidón. Se prefiere particularmente almidón nativo como primer sustrato. El almidón nativo proporciona gránulos densamente empaquetados que son particularmente propicios para su suspensión/incorporación en recubrimientos de superficie. Además, el almidón nativo es insoluble en agua.

También se prefiere particularmente celulosa como primer sustrato. La celulosa es un componente común en pintura y el uso de celulosa como primer sustrato reduce el número de componentes adicionales que deben añadirse a una composición de pintura.

Cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado

En un aspecto, la composición comprende un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado y comprende además una primera enzima y un primer sustrato. En este aspecto, preferiblemente el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende una enzima oxidasa. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende una enzima seleccionada de glucosa oxidasa, L-aminoácido oxidasa, D-amino oxidasa, galactosa oxidasa, hexosa oxidasa, piranosa oxidasa, malato oxidasa, colesterol oxidasa, arilalcohol oxidasa, alcohol oxidasa, latosterol oxidasa, aspartato oxidasa, amina oxidasa, D-glutamato oxidasa, etanolamina oxidasa, NADH oxidasa, urato oxidasa (uricasa) y mezclas de las mismas. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende una enzima seleccionada y glucosa oxidasa, hexosa oxidasa y una mezcla de las mismas.

Preferiblemente, en un aspecto el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende glucosa oxidasa. Preferiblemente, la glucosa oxidasa es glucosa oxidasa de *Aspergillus niger.* Preferiblemente, la glucosa oxidasa es glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* y puede prepararse tal como se describe en el documento US5783414. Preferiblemente, la glucosa oxidasa es glucosa oxidasa GC199 disponible de Genencor International Inc, Rochester, NY, EE.UU.

Preferiblemente, en un aspecto el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende hexosa oxidasa. Preferiblemente, la hexosa oxidasa puede obtenerse o se obtiene a partir de *Chondrus cripus.* En un aspecto, la enzima hexosa oxidasa es una enzima cubierta por la descripción del documento EP-A-0832245.

Segundo sustrato

Preferiblemente, el segundo sustrato se selecciona de péptidos, L-aminoácidos e hidratos de carbono/azúcares, incluyendo hexosas, preferiblemente glucosa, galactosa, lactosa, 2-desoxiglucosa, piranosa, xilano, celulosa, inulina, almidón, dextrano, pectina, y mezclas de los mismos.

Enzimas/sustratos

En una realización preferida el segundo sustrato/cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado comprende una segunda combinación de sustrato/enzima seleccionada de glucosa/hexosa oxidasa, glucosa/glucosa oxidasa, L-aminoácido/L-aminoácido oxidasa, galactosa/galactosa oxidasa, lactosa/β-galactosidasa/hexosa oxidasa, lactosa/β-galactosidasa/glucosa oxidasa, 2-desoxiglucosa/glucosa oxidasa, piranosa/piranosa oxidasa, y mezclas de los mismos. Claramente, la enzima de estas segundas combinaciones de sustrato/enzima se reticula antes de usarse en la composición.

Preferiblemente, la primera combinación de sustrato/primera enzima/cristal enzimático reticulado o agregado

enzimático reticulado es almidón/CLEC o CLEA de glucoamilasa/hexosa oxidasa. Preferiblemente, el compuesto antiincrustación es peróxido de hidrógeno.

En un aspecto preferido, la primera enzima está presente en una cantidad tal que su actividad es menor que la actividad de la enzima reticulada con una enzima con agente de reticulación multifuncional. Por tanto, la primera enzima limitará la tasa de formación de compuesto antiincrustante. Por tanto, en un aspecto preferido, la razón de actividad de primera enzima:cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado es mayor de 1:1, preferiblemente al menos de 1:2, preferiblemente al menos de 1:10, preferiblemente al menos de 1:20, preferiblemente al menos de 1:50, preferiblemente al menos de 1:100, preferiblemente al menos de 1:1000, preferiblemente al menos de 1:10000. La actividad se define como la liberación de sustrato para la primera enzima y recambio de ese sustrato para la segunda enzima en las condiciones dadas (es decir agua de mar para aplicaciones marinas).

Preferiblemente, la composición y/o el recubrimiento comprenden además un pigmento. Pueden seleccionarse pigmentos adecuados de pigmentos inorgánicos, tales como dióxido de titanio, óxido férrico, sílice, talco o caolín, pigmentos orgánicos tales como negro de humo o colorantes insolubles en medios acuosos, preferiblemente agua de mar, derivados y mezclas de los mismos.

La composición y/o el recubrimiento de la presente invención pueden comprender además un aglutinante.

La composición y/o el recubrimiento de la presente invención pueden contener plastificantes, modificadores de características reológicas, otros componentes convencionales y mezclas de los mismos.

La composición de la presente invención, particularmente cuando se formula como recubrimiento, puede comprender además un adyuvante empleado de manera convencional en composiciones usadas para proteger materiales expuestos a un entorno acuático. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen fungicidas adicionales, disolventes auxiliares, aditivos de procesamiento tales como desespumantes, fijadores, plastificantes, estabilizadores de UV o potenciadores de la estabilidad, colorantes solubles en agua o insolubles en agua, pigmentos de color, desecantes, inhibidores de la corrosión, espesantes o agentes antisedimentación tales como carboximetilcelulosa, poli(ácido acrílico) o poli(ácido metacrílico), agentes antidesprendimiento, derivados y mezclas de los mismos.

Proceso para la preparación de una composición

Cuando la composición es una pintura a base de aceite, preferiblemente el proceso incluye la etapa (b) secar el cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado. El secado del cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado hace que la enzima sea miscible con un disolvente orgánico.

Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado se seca por congelación o se seca por pulverización.

De manera adecuada, el cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado se seca por congelación.

De manera adecuada, el cristal enzimático reticulado o el agregado enzimático reticulado se seca por pulverización.

Preferiblemente, el procedimiento incluye la etapa opcional (c). Preferiblemente, la hidrofobicidad de la superficie del cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado aumenta mediante la adición de un tensioactivo.

Usos

También se describe el uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado para inhibir la incrustación. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado se usa para inhibir la incrustación en un entorno marino. Preferiblemente, el cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado se usa para inhibir la incrustación provocada por la formación de biopelícula. Este uso se refiere a un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado que puede comprender cualquiera de las características relativas a cristales, agregados, la enzima y el agente de reticulación multifuncional descritos en el presente documento. Preferiblemente, el agente de reticulación multifuncional usado comprende dos o más grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído, imida, cianato, isocianato y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, la enzima usada se selecciona de hidrolasas, oxidorreductasas, transferasas, liasas e isomerasas. Más preferiblemente la enzima usada se selecciona de una proteasa, hexosa oxidasa, glucosa oxidasa y alcohol deshidrogenasa (ADH). Preferiblemente, la proteasa es una subtilisina.

Componentes/aspectos adicionales

Preferiblemente, la enzima está presente en una cantidad eficaz para reducir o prevenir la incrustación de una

superficie recubierta con la composición.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse como recubrimientos, lacas, tinturas, esmaltes y similares, denominados a continuación en el presente documento genéricamente “recubrimiento(s)”.

Por tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un recubrimiento que consiste en una composición tal como se define en el presente documento.

Preferiblemente, el recubrimiento se formula para el tratamiento de cualquier superficie que esté en contacto con agua que va desde humedad ocasional a inmersión constante en agua y que por tanto tiene el potencial de presentar incrustación. Más preferiblemente, la superficie se selecciona de trabajo en madera de exterior, superficie externa de un sistema de refrigeración o calefacción central, paredes de cuartos de baño, el casco de un buque marino o cualquier instalación marítima, y superficies en procedimientos de producción/envasado de alimentos y/o cualquier otro procedimiento industrial.

El recubrimiento puede incluir un vehículo líquido (disolvente) para disolver o suspender la composición.

El vehículo líquido puede seleccionarse de cualquier líquido en el que pueda disolverse o suspenderse de manera adecuada cualquier componente esencial de la composición. En particular, el líquido debe ser un vehículo adecuado para el compuesto antiincrustante y/o la(s) enzima(s) esencial(es), permitiendo la actividad apropiada de los mismos. Se dan a conocer vehículos líquidos adecuados en el documento US-A-5071479 e incluyen agua y disolventes orgánicos incluyendo hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, tales como xileno, tolueno, mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos que tienen puntos de ebullición de entre 100 y 320ºC, preferiblemente entre 150 y 230ºC; destilados del petróleo de alta aromaticidad, por ejemplo, nafta disolvente, aceite de alquitrán destilado y mezclas de los mismos; alcoholes tales como butanol, octanol y glicoles; aceites vegetales y minerales; cetonas tales como acetona; fracciones del petróleo tales como alcoholes minerales y queroseno, hidrocarburos clorados, ésteres de glicol, éteres de ésteres de glicol, derivados y mezclas de los mismos.

El vehículo líquido puede contener al menos un disolvente polar, tal como agua, en mezcla con un disolvente orgánico de baja volatilidad aceitoso o de tipo aceite, tal como la mezcla de disolventes aromáticos y alifáticos hallada en alcoholes blancos, también denominados comúnmente alcoholes minerales.

El vehículo puede contener normalmente al menos uno de un diluyente, un emulsionante, un agente humectante, un agente dispersante u otro agente tensioactivo. Se dan a conocer ejemplos de emulsionantes adecuados en el documento US-A-5071479 e incluyen éteres de nonilfenol-óxido de etileno, ésteres de polioxietileno-sorbitol o ésteres de polioxietileno-sorbitano de ácidos grasos, derivados y mezclas de los mismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un antiincrustante marino que consiste en una composición tal como se define en el presente documento.

Preferiblemente, la composición o el recubrimiento son de autopulido.

La composición de la presente invención puede proporcionarse como un producto listo para usar o como un concentrado. El producto listo para usar puede estar en forma de un polvo, una disolución en aceite, dispersión en aceite, emulsión o una preparación de aerosol. El concentrado puede usarse, por ejemplo, como aditivo para recubrimiento, o puede diluirse antes de su uso con disolventes o agentes de suspensión adicionales.

Una preparación de aerosol según la invención puede obtenerse de la manera habitual incorporando la composición de la presente invención que comprende o suspenderse en, un disolvente adecuado, en un líquido volátil adecuado para su uso como propelente, por ejemplo la mezcla de derivados de cloro y flúor de metano y etano disponible comercialmente con la marca comercial “Freon”, o aire comprimido.

Tal como se comenta en el documento US-A-5071479 la composición y/o el recubrimiento de la presente invención puede incluir componentes adicionales que se sabe que son útiles en conservantes y/o recubrimientos. Tales componentes incluyen fijadores tales como carboximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), parafina, codisolventes, tales como acetato de etilglicol y acetato de metoxipropilo, plastificantes tales como ésteres del ácido benzoico y ftalatos, por ejemplo, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo y ftalato de didodecilo, derivados y mezclas de los mismos. Opcionalmente también pueden incluirse colorantes, pigmentos de color, inhibidores de la corrosión, estabilizadores químicos o desecantes (secadores) tales como octato de cobalto y naftenato de cobalto, dependiendo de aplicaciones específicas.

La composición y/o el recubrimiento de la presente invención pueden aplicarse mediante cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica incluyendo cepillado, pulverización, recubrimiento con rodillos, inmersión y combinaciones de los mismos.

Pueden prepararse composiciones de la presente invención simplemente mezclando los diversos componentes a

una temperatura a la que no se ven afectados adversamente. Las condiciones de preparación no son críticas. Pueden emplearse ventajosamente el equipo y los métodos empleados de manera convencional en la fabricación de recubrimientos y composiciones similares.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inhibir la formación de biopelícula sobre un artículo que comprende poner en contacto el artículo con una cantidad eficaz de una composición tal como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inhibir la formación de biopelícula sobre un artículo que comprende aplicar al artículo una cantidad eficaz de una composición tal como se define en el presente documento.

Estos métodos para inhibir la formación de biopelícula se refieren a métodos que comprenden un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado que puede comprender además cualquier de las características relativas a cristales, agregados, la enzima y el agente de reticulación multifuncional descritos en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un artículo dotado de una composición antiincrustación tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, la composición antiincrustación se proporciona como un recubrimiento sobre el artículo.

Preferiblemente, el artículo se selecciona de un casco de un buque marino, un dispositivo médico, una lente de contacto, aparato de procesamiento de alimentos, aparato de fabricación de papel, aparato de procesamiento y recuperación de petróleo, una instalación marítima (por ejemplo una plataforma de producción de petróleo o plataforma petrolífera), aparato de dispensación de agua potable, una tubería, un cable, una red de pesca, un pilar de un puente, la superficie externa de un sistema de calefacción central, una instalación o edificio portuario.

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle a modo de ejemplo únicamente con referencia a las figuras adjuntas en las que:

la figura 1 muestra una visión general esquemática de la química de componentes estructurales de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) implicadas en biopelículas bacterianas;

la figura 2 muestra cristales de la proteasa subtilisina;

la figura 3 muestra un diagrama de barras de la actividad proteasa en pintura;

la figura 4 muestra paneles de un ensayo de plataformas de campo;

la figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos para SEQ ID n.º 1;

la figura 6 muestra el rendimiento catalítico de lacasas en diferentes sistemas;

la figura 7 muestra el rendimiento catalítico relativo de lacasas en pintura secada;

la figura 8 muestra el rendimiento catalítico relativo de subtilisina y complejo de subtilisina-quitosano en pintura secada;

la figura 9 muestra el rendimiento catalítico de proteasas en diferentes sistemas;

la figura 10 muestra el rendimiento catalítico de proteasas en pintura marina secada;

la figura 11 muestra el rendimiento catalítico relativo de proteasas en pintura marina secada;

la figura 12 muestra el esquema principal de activación del catalizador durante la incubación en ASW; y

la figura 13 muestra micrografías de MEB de proteasas.

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

ENSAYOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIINCRUSTACIÓN

De particular relevancia para esta invención son las enzimas que presentan actividad antiincrustación. Esta actividad puede oscilar entre ser una característica general frente a una amplia gama de incrustantes y una actividad antiincrustación específica frente a una única especie. Preferiblemente, un recubrimiento que contiene una enzima

en cualquier forma (soluble, inmovilizada, reticulada, modificada químicamente) en una concentración en peso de la enzima activa preferiblemente menor del 20% de enzima, más preferiblemente menor del 10% de enzima y más preferiblemente menor del 5% de enzima, e incluso más preferiblemente menor del 1% de enzima mostrará una mayor resistencia a la incrustación según la norma ASTM D 6990 - 05: "Standard Practice for Evaluating The Biofouling Resistance and Physical Performance of Marine Coating Systems" (Práctica habitual para evaluar la resistencia a la bioincrustación y el rendimiento físico de sistemas de recubrimiento marino) que un recubrimiento de referencia sin enzima activa en al menos una de las inspecciones tal como se describe en el ejemplo 4, sin limitarse a la ubicación física de los ensayos en el mar. O bien, cuando puede detectarse una actividad antiincrustación usando cualquiera de los ensayos según el documento WO2008/013747 para incrustación bacteriana o según Pettitt *et al* (Biofouling, 2004, 20 (6), págs. 299 - 311) para incrustación de percebes y algas en la que es detectable un cambio significativo en la adhesión y/o sedimentación y/o motilidad de los organismos y/o retirada cuando una concentración en peso de la enzima activa es preferiblemente menor del 20%, más preferiblemente menor del 10%, más preferiblemente menor del 5% e incluso más preferiblemente menor del 1%. Esto es sin limitarse a las cepas específicas de los organismos descritos por el documento WO2008/013747 o Pettitt *et al*.

Ejemplos:

Se somete a prueba el efecto antiincrustación de una composición antiincrustación de la técnica que contiene cristales de proteasa reticulados según los siguientes ejemplos. Estos ejemplos muestran la eficacia de la presente composición en la prevención de la incrustación.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE CRISTALES DE PROTEASA

Se prepararon cristales de una proteasa subtilisina con la secuencia mostrada en SEQ ID NO 1. La subtilisina se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y puede prepararse tal como se describe en el documento US 5.441.882.

La disolución acuosa que actúa como material de partida para el método se deriva del caldo de fermentación producido por la fermentación de un microorganismo apropiado. Los procedimientos de fermentación para cultivar células y para la producción de proteína se conocen en sí mismos en la técnica.

Se llevó a cabo ultrafiltración del caldo libre de células con una membrana de polisulfona que tenía un punto de corte de peso molecular de 10 kDa en una unidad de ultrafiltración espiral para proporcionar el concentrado de ultrafiltración (CUF). La disolución de proteasa resultante estaba a una concentración de aproximadamente 100 g/l de enzima activa. La concentración de proteasa puede determinarse mediante el método descrito en Estell *et al*. (1985) J. Biol. Chem. 260:6518-6521.

Se mezcló el CUF que contenía proteasa con formiato de sodio en tres etapas hasta una concentración de formiato final del 5%. Cada etapa duró 20 min y se mantuvo la temperatura a 5ºC a lo largo de todo el procedimiento. Se ajustó el pH a 5,5 usando o bien NaOH al 20% o bien ácido fórmico al 20% y se añadió el 0,1% de simiente cristalina. Se permitió que avanzase la cristalización durante 4 días y se muestra una fotografía de los cristales resultantes en la figura 2. Se diluyó la suspensión espesa con disolución de formiato al 5% y $CaCl_2$ al 0,01% en una razón de 1:0,75, y se recuperaron los cristales por centrifugación. Se almacenó el sedimento resultante a -20ºC hasta su uso adicional.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE CLEC (CRISTALES ENZIMÁTICOS RETICULADOS)

Se reticularon cristales de proteasa con glutaraldehído para proporcionar partículas sólidas que son insolubles en un sistema acuoso. Se añadió glutaraldehído a los cristales de proteasa obtenidos en el ejemplo 1 hasta una concentración final del 1% (vol.) de la pasta y se incubaron con agitación suave durante 3 horas a 4ºC. Después de esto se secó por congelación esta disolución y se trituró el material obtenido en un mortero para obtener un polvo seco con un tamaño de partícula fino adecuado para la aplicación de pintura.

EJEMPLO 3: ACTIVIDAD EN PINTURA DE CLEC

Se añadieron cristales de proteasa al 4% (p/v) de una pintura antiincrustación comercial (Mille Light de Hempel A/S) tanto en la forma reticulada como no reticulada. Se aplicó la pintura resultante por triplicado y para cada reproducción en dos capas en el interior de placas de cultivo tisular de poliestireno de 6 pocillos. Se permitió entonces que se secase la pintura durante tres días a temperatura ambiente. Además, se incluyó una pintura que contiene proteasa comercial, Coatzyme obtenida de BioLocus A/S, Dinamarca, en el ensayo para evaluación comparativa.

Se sumergieron las placas en un gran exceso de agua de mar artificial (ASW) (NaCl: 24,0 g/l, $MgCl_2$ 5,1 g/l, Na_2SO_4 4,0 g/l, $CaCl_2$ 1,1 g/l, KCl 0,67 g/l, KBr 0,098 g/l, H_3BO_3 0,027 g/l, $SrCl_2$ 0,024 g/l, NaF 0,003 g/l, $NaHCO_3$ 0,196 g/l). A intervalos regulares, se extrajeron las placas del ASW y se sometió a ensayo la actividad proteasa (figura 3) antes de que se sumergieran las placas en un nuevo lote de ASW. El ensayo de proteasa se basaba en la capacidad de una proteasa para escindir p-nitroanilida de un péptido sintético, succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilida (suc-AAApNA)

(Sigma S4760), dando como resultado un aumento en la absorbancia a 405 nm. Para el ensayo, se preparó una disolución de sustrato de trabajo mezclando 400 µl de una disolución madre de sustrato (suc-AAApNA 30 mg/ml en DMSO) con 19,6 ml de disolución tampón (Tris 0,1 M; $CaCl_2$ 0,01 M; Triton X-100 al 0,005%; pH 8,6). Se añadieron tres mililitros de la disolución de sustrato de trabajo a cada pocillo recubierto con pintura y se usó el aumento en la absorbancia a 405 nm como medida de la actividad enzimática. Se fijó la actividad medida tras 2 horas de hidratación de las pinturas en ASW como el 100% (día 0, figura 3). Se midió la actividad proteasa para los tres recubrimientos en los días indicados. Se concluye que los cristales reticulados son superiores tanto con respecto a los cristales no reticulados como a la pintura Coatzyme en la conservación de la actividad enzimática en pintura.

EJEMPLO 4: PROPIEDADES ANTIINCRUSTACIÓN DE PINTURA QUE CONTIENE CLEC

Se preparó pintura que contenía cristales de proteasa tal como se describe en el ejemplo 3 con la excepción de que sólo se añadió el 2% (p/v) de cristales de proteasa reticulados a la pintura Mille Light. Se aplicó la pintura con CLEC resultante por duplicado a paneles de rotor de 15 por 7,5 cm y se montaron en plataformas que se sumergieron en el Mar del Norte. El ensayo de plataformas se inició en julio de 2008 y terminó a comienzos de noviembre de 2008, con una temperatura del agua de mar promedio notificada de 17ºC a lo largo de todo el periodo de ensayo. Se inspeccionaron visualmente las plataformas de manera regular para determinar la naturaleza y densidad de la bioincrustación, y se tomaron imágenes para documentación (figura 4). Las imágenes en la figura 4 se tomaron tras los días de inmersión indicados en la parte izquierda de los paneles. Los recuadros izquierdo y derecho son fotografías de los duplicados.

Se cuantificó la incrustación sobre los paneles y se muestra el promedio de los dos duplicados para los días 14-84 y para cada panel en el día 97 en la tabla 1:

Tabla 1: Cuantificación de la incrustación sobre los paneles.
GA = algas verdes, B = percebes, D = diatomeas, yB = percebes jóvenes (sin sedimentación permanente)

Días	**Sin enzima (Mille Light)**	**CLEC**	**Mille Xtra**
14		Fango + yB	Fango + yB
28	Fango	Fango + yB	Fango
42	Fango, 5% de GA, yB	Fango, yB y mejillones	Fango, 10% de GA, yB
55	Fango, 5% de GA, 10% de D, yB	Fango, 2B, yB	Fango, 5-10% de D, 5B, yB
67	Fango, yB, 5-15 B, 5% de GA, 20% de D	Fango, 5B, 10-15% de D	Fango, yB, 20-30% de D
97_rack1	Fango, **25% de D**	Fango, **5% de D,** 5% de GA	Fango, 15% de D
97_rack2	Fango, 10 B, **60% de D,** 10% de GA, 1 ostra	Fango, **25% de** D, 6B	Fango, 60% de D

Las observaciones importantes tras 42 días de inmersión incluyen el desarrollo de algas verdes sobre pinturas sin enzima, que no se observa sobre la pintura con CLEC. La pintura Mille Light sin enzima muestra más desarrollo de percebes que la pintura con CLEC tras 67 días y tras 97 días se observa una incrustación de diatomeas significativamente menor sobre la pintura con CLEC que ambas pinturas sin enzimas de referencia.

Se puntuó el rendimiento global de las pinturas en el día 97 usando un método derivado de la norma ASTM D6990 en el que se puntúa la resistencia a la incrustación (FR) de los paneles restando o bien la cobertura en porcentaje o bien el número real de organismos contados sobre cada panel (con la excepción de fango en el que se resta un valor de 1) de un valor de 100 (tabla 2). Los valores entre 0 (sin actividad antiincrustación en absoluto) y 100 (superficie de la pintura perfectamente limpia) indican el grado de protección de los paneles individuales a través del ensayo. Cuanto mayor es la tasa de FR, mejor es el rendimiento antiincrustación.

Tabla 2: Resistencia a la incrustación (FR) de recubrimientos.

	FR de ambos paneles	**FR (promedio)**
Pintura con CLEC	89; 68	78,5
Mille Light	74; 18	46
Mille Xtra	84; 49	66,5

La pintura que contiene enzima muestra una mejor resistencia a la incrustación que ambas pinturas de referencia.

EJEMPLO 5: ACTIVIDAD PROTEASA EN EL MAR DE PINTURA CON CLEC

Se sometió a ensayo la actividad proteasa de la pintura con CLEC por duplicado usando un ensayo semicuantitativo sobre un panel que se ha tratado tal como se describe en el panel 4, pero usado exclusivamente para ensayos de

enzima. Se limpió suavemente la incrustación de los paneles antes del ensayo. Se realizó el ensayo como una prueba de gota en la que se aplicaron a la superficie 940 µl de tampón 1 (Tris 100 mM, Tween 80 al 0,005%, pH 8,6) y 50 µl de tampón 2 (30 mg de N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida disueltos en 300 µl de dimetilsulfóxido (Sigma-Fluka 41650)). Se determinó el tiempo que llevó que se desarrollase un color brillante basándose en inspección visual usando una gota que consiste en agua desionizada como referencia. Se realizó el ensayo sobre la pintura Mille Light (es decir sin enzima presente) como control negativo puesto que el color se desarrollará espontáneamente a lo largo de tiempos de incubación prolongados.

Se presentan los resultados en la tabla 3. Aun cuando se observó un ligero desarrollo de color algunas veces para la pintura Mille Light, la actividad observada en la pintura con CLEC era significativa y detectable incluso tras 97 días de inmersión en el mar.

Tabla 3: Actividad enzimática en el mar.
Se determinó la actividad proteasa en los días indicados usando un ensayo semicuantitativo tal como se describe en el texto. En el ensayo semicuantitativo, cortos tiempos de incubación indican alta actividad. ND: no detectable.

Días	**Sin enzima (Mille Light)**	**CLEC**
14	10 min	2 min
28	ND	5 min
42	5 min, color ligero	5 min
55	30 min, color ligero	5 min, color ligero
67	ND	10 min, color ligero
97	ND	10 min, color ligero

EJEMPLO 6: ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CATALIZADORES BASADOS EN LACASA

Materiales y métodos

Se obtuvieron (CLEA) de lacasa de *Tremetes versicolor,* ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), ABTS, y sales tamponantes de Sigma-Aldrich. Se obtuvo lacasa nativa de *Tremetes sp.* de CLEAs Technologies B.V. Se usó pintura Mille Light de Hempel A/S como pintura de blanco. El agua de mar artificial (ASW) usada contenía NaCl 547,6 mM, $MgSO_4x7H_2O$ 56,8 mM y $NaHCO_3$ 2,4 mM, pH 8,2 (Yebra, D. M., Kiil, S., Weinell, C. E., y Dam-Johansen, K. (2006). Parametric study of tin-free antifouling model paint behavior using rotary experiments. Industrial & Engineering Chemistry Research 45, 1636-1649, *Activity* assay). Se prepararon todas las disoluciones acuosas con agua desionizada.

Se determinó la actividad catalítica del catalizador por su capacidad para dar ABTS oxidado mediante la monitorización del aumento de la absorbancia a 405 nm mediante un lector de ELISA (Molecular Devices). Se corrigió la señal de absorbancia para las mediciones del espectrofotómetro con una longitud de cubeta de 1 cm y un coeficiente de extinción de 35 mM^{-1} cm^{-1} (J.D Crowe y S. Olsson App. Environ. Microbiol. 67 (2001) 2088-2094).

Para monitorizar la reacción catalítica, se dispersó polvo de enzima en 10 µl de acetato de sodio 100 mM, BSA al 1%, pH 5,0. Entonces se añadieron 160 µl de tampón que contenía ABTS 6,2 mM al sistema. Se determinó la actividad catalítica de muestras como la producción de producto en nmol en 1 min por 1 mg de enzima.

Para determinar la actividad catalítica de lacasa en pintura, se dispersaron 200 mg de catalizador en 400 µl de xileno. Entonces se añadió la mezcla a 5 ml de pintura. Entonces se aplicó la mezcla de pintura/catalizador a una "película de transparencia para escribir encima" mediante cepillo. Se secaron las películas pintadas durante 24 h.

Resultados y discusión

Para identificar la actividad inicial de los catalizadores, se ha realizado el examen de su rendimiento en el tampón (véase la tabla 4). Tal como puede observarse a partir de la tabla, la lacasa no modificada tiene la mayor actividad. Sin embargo, en ASW, no se detectó en absoluto actividad catalítica de la lacasa nativa.

Tabla 4: Actividad catalítica de lacasas en tampón, ASW y tras el tratamiento mediante xileno.

Enzimas	**Actividad, nmol min^{-1} mg^{-1}**		
	Tampón	**ASW**	**Xileno**
CLEA de lacasa	100	3	122
Lacasa nativa	746	ND	978

Estos resultados indican que el pH de ASW es un factor crucial para el rendimiento catalítico. A pH 8,2 la lacasa nativa no es activa, mientras que los CLEA de lacasa todavía presentan cierta actividad. Sin embargo, tras sumergir el catalizador en el sistema tamponante de pH 5,0, se recuperó por completo la actividad catalítica.

También se estudió la tolerancia de estas enzimas a xileno. Se eligió el xileno como ejemplo de un disolvente orgánico que se usa para producir pinturas. Se incubaron los catalizadores en xileno de calidad técnica durante 24 horas. Tras el secado completo del xileno, se dispersaron los catalizadores en tampón de pH 5,0 y se midió la actividad catalítica. Se encontró que el xileno no afectaba al rendimiento catalítico de estas lacasas. Tanto la enzima nativa como los agregados enzimáticos presentaron un aumento del rendimiento catalítico. Un posible motivo de esto es que el xileno puede disolver pequeñas impurezas orgánicas, que pueden haberse absorbido en la superficie de la proteína durante la producción del catalizador y que pueden inhibir parcialmente el rendimiento de la enzima.

Por tanto, los resultados muestran que la lacasa puede conservar actividad residual en ASW sólo en forma de CLEA. Para identificar la relevancia de catalizadores basados en lacasa para aplicaciones de pintura diferentes a las marinas, se han realizado los estudios de pintura secada que contiene lacasas en acetato de sodio 100 mM, BSA al 1%, pH 5,0.

Se presentan los resultados en la figura 7. Tal como puede observarse a partir de la figura, la lacasa no modificada perdió rápidamente actividad catalítica en pintura secada sumergida en el tampón. Tras 8 días, la lacasa conserva sólo aproximadamente el 13% de la actividad. En cambio, la actividad catalítica de CLEA de lacasa aumenta durante el periodo estudiado. Ya en el 3er día, los CLEA tienen una actividad de aproximadamente el 1200% de la inicial, que corresponde a una tasa catalítica 4 veces mayor de generación de producto en comparación con la lacasa no modificada. Tras 8 días, los CLEA son 10 veces más activos que la lacasa nativa.

Conclusión

Por tanto, los catalizadores de lacasa estudiados son tolerantes a la presencia de xileno. Sin embargo, sólo la lacasa en CLEA conserva cierta actividad en ASW. Los estudios de lacasa en pintura muestran que la lacasa no modificada perdió aproximadamente el 90% de actividad tras 8 días, mientras que lacasa en CLEA aumenta aproximadamente el 1200% de actividad.

EJEMPLO 7: DESARROLLO DE UN CATALIZADOR BASÁNDOSE EN RETICULACIÓN DE SUBTILISINA CON QUITOSANO PARA APLICACIONES DE PINTURA ANTIINCRUSTACIÓN MARINA

Materiales

Se obtuvieron subtilisina, succinil-alanina-alanina-alanina-p-nitroanilida (suc-AAApNa), sales tamponantes de Sigma-Aldrich.

Se usó la pintura Mille Light de Hempel A/S como pintura de blanco.

El agua de mar artificial, ASW, contiene NaCl 547,6 mM, $MgSO_4x7H_2O$ 56,8 mM y $NaHCO_3$ 2,4 mM. Se prepararon todas las disoluciones acuosas con agua desionizada.

Modificación acética de quitosano

Se mezcló polvo de quitosano con el 2% (p/p) de ácido acético y agitación durante la noche para proporcionar una disolución al 1% (p/p) de polímero modificado con acetato. Se mezcló esta disolución con un exceso en volumen de 7-10 veces de acetona, y se precipitó el acetato de quitosano. Se filtró el producto a través de una membrana y se secó. Se usó nitrógeno líquido para enfriar el material secado y se trituró éste para proporcionar un polvo.

Preparación de películas de subtilisina-quitosano

Se mezcló acetato de quitosano con tampón acetato 0,1 M, pH 5,5 y se agitó durante la noche para proporcionar una disolución al 1%. Se preparó una disolución de subtilisina 75 mg/ml en tampón acetato 0,1 M, pH 5,5, que también contenía $CaCl_2$ 15 mM. Se mezcló la disolución de acetato de quitosano con la disolución de subtilisina en la razón (4:1) y se agitó durante 2 h. Se secó la mezcla resultante mediante burbujeo de gas de N_2 a través de la misma durante la noche. Se agitó dos veces el precipitado obtenido con una disolución de glutaraldehído al 2% en agua durante 1 h cada vez. Se lavó el catalizador resultante tres veces usando tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2 que contenía $CaCl_2$ 5 mM durante 2 h cada vez. El sólido entonces se dejó secar al aire para proporcionar el catalizador como un polvo.

Preparación de pintura de subtilisina-quitosano

Se prepararon dos mezclas de pintura diferentes, una con subtilisina reticulada-quitosano, y la segunda con un

complejo de quitosano-subtilisina unido de manera no covalente (preparado como anteriormente pero sin tratamiento mediante glutaraldehído). Se produjeron ambas mezclas de pintura tal como sigue; en primer lugar, se suspendieron 250 μg de catalizador secado en un volumen mínimo de xileno (>1 ml) que entonces se mezcló vigorosamente con 10 g de pintura Mille Light. Entonces se aplicó la mezcla de pintura/catalizador a una "película de transparencia para escribir encima" con un grosor de pintura de 300 μm y una anchura de ~5 cm usando un aplicador de película Baker. Se dejó que las películas de pintura se secasen durante la noche.

Tras el secado, se recortaron pequeños círculos de las películas que contienen pintura (2,5 cm de diámetro) y se pegó cada círculo a un pocillo en una placa Multidish y se dejaron en ASW durante 1 hora. Entonces se enjuagó cada pocillo con agua desmineralizada y se usaron las películas para la medición de la actividad.

Ensayo de actividad

Se determinó la actividad catalítica de cada catalizador por su capacidad para escindir *p*-nitroanilida de un péptido sintético, succinil-alanina-alanina-alanina-p-nitroanilida, suc-AAApNa, mediante la monitorización del aumento de la absorbancia a 405 nm [absorbancia de *p*-nitroanilida, el coeficiente de extinción determinado para un lector de placas (volumen de 250 μl) es de 11800 M^{-1} cm^{-1}, para un espectrofotómetro es de 18300 M^{-1} cm^{-1}]. Para monitorizar la reacción catalítica, se disolvió polvo de enzima en tampón Tris-HCl 0,1 M que contenía $CaCl_2$ 0,01 M, Triton X-100 al 0,005%, pH 8,6. Se mezclaron 100 μl de esta disolución de enzima con 1 ml de disolución de sustrato, que contenía el 0,2% de suc-AAApNA en tampón. Se determinó la actividad catalítica de las muestras como la generación de 1 μmol de producto por 1 mg de enzima en 1 min.

Medición de la actividad catalítica de subtilisina-quitosano en pintura

En primer lugar, se preparó una disolución de sustrato (suc-AAApNa 30 mg/ml en DMSO) al 2% (v/v) en tampón (tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,6 que contenía $CaCl_2$ 0,01 M y Triton X-100 al 0,005%). Entonces, se añadieron 3 ml de esta disolución de sustrato a cada pocillo que contenía película y a un pocillo vacío para referencia. Entonces se realizaron mediciones de absorbancia a 405 nm tras 1 hora y tras 24 horas.

Resultados y discusión

Es necesario que las enzimas que son adecuadas para su uso en pinturas a base de disolventes orgánicos cumplan varios criterios. Estos criterios incluyen ser lo suficientemente rígidas como para no destruirse durante el mezclado con la pintura y durante el secado de la capa de pintura sobre una superficie. Además, la modificación de la enzima debe tener lugar en condiciones suaves para evitar la destrucción del catalizador. Un enfoque es el atrapamiento de la enzima en una red de polisacárido mantenida por enlaces de hidrógeno seguido por precipitación y reticulación. Puesto que la subtilisina es una molécula cargada positivamente, se modificaron los grupos amino del quitosano mediante acetato antes de añadir la enzima, de modo que se proporcionase una interacción de cargas entre la enzima y el quitosano.

Tras la formación de un complejo de polielectrolito, se precipitó el catalizador a partir de la disolución mediante secado usando burbujeo de gas de N_2. Entonces, para estabilizar el catalizador obtenido, se reticuló el precipitado usando glutaraldehído. Este procedimiento permitió la formación de los complejos de quitosano-quitosano, enzima-enzima y quitosano-enzima que se mezclaron entre sí formando películas.

El análisis enzimático del catalizador obtenido muestra que la carga final del sistema fue de aproximadamente 146 mg por 1 g de catalizador que es casi 2 veces mayor de lo notificado previamente (Macquarrie, D. J. y Bacheva, A. (2008) Green Chemistry 10, 692-695).

Los estudios de actividad catalítica de complejos de subtilisina-quitosano y subtilisina no modificada se han realizado en pintura secada. No se detectó la actividad catalítica de complejos de subtilisina modificada de manera no covalente-quitosano. Se presentan los resultados de rendimiento catalítico de complejos de subtilisina modificada de manera covalente-quitosano y subtilisina no modificada en la figura 8. Tal como puede observarse a partir de la figura, la subtilisina no modificada perdió aproximadamente el 80% de actividad tras 14 días, mientras que el catalizador de subtilina-quitosano adquiere aproximadamente el 300% de actividad en pintura durante el mismo periodo de tiempo.

EJEMPLO 8: IMPLEMENTACIÓN DE APLICACIONES DE PINTURA MARINA ANTIINCRUSTACIÓN CON AGREGADOS ENZIMÁTICOS RETICULADOS DE PROTEASAS

Materiales

Se obtuvieron la subtilisina, succinil-alanina-alanina-alanina-p-nitroanilida (suc-AAApNa) y sales tamponantes de Sigma-Aldrich.

Se adquirió el xileno de Merck.

Se obtuvieron los CLEA de proteasas de *B. subtilis, B. lentus* (esperasa), *B. licheniformis* (alcalasa) y *B. clausii* (savinasa) de CLEAs Technologies B.V.

Se usó la pintura Mille Light de Hempel como pintura de blanco.

Se prepararon todas las disoluciones acuosas con agua desionizada.

El ASW contiene NaCl 547,6 mM, $MgSO_4x7H_2O$ 56,8 mM y $NaHCO_3$ 2,4 mM.

Ensayo de actividad

Se determinó la actividad catalítica de cada catalizador por su capacidad para escindir p-nitroanilida de un péptido sintético, suc-AAApNa, mediante la monitorización del aumento de la absorbancia a 405 nm mediante un lector de ELISA (Molecular Devices). Para monitorizar la reacción catalítica, se dispersó polvo de enzima en tampón Tris-HCl 0,1 M que contenía $CaCl_2$ 0,01 M y Tritonx-100 al 0,005% pH 8,2. Se mezclaron 20 µl de cada disolución de enzima con 200 µl de disolución de sustrato, que contenía el 0,2% de suc-AAApNA en tampón. Se determinó la actividad catalítica de muestras como la generación de 1 µmol de producto por 1 mg de enzima en 1 min.

Resultados y discusión

Para identificar la actividad inicial de los catalizadores, se realizó el examen de su rendimiento en tampón alcalino (véase la tabla 5). Tal como puede observarse a partir de la tabla, la subtilisina no modificada tiene la mayor actividad. La mayor parte de los CLEA tienen actividad similar en tampón. La única excepción es el rendimiento de CLEA de *B. lentus.*

Entonces se sometió a prueba la tolerancia de estas enzimas para entornos marinos. Por tanto, se sometió a prueba la actividad catalítica de estas enzimas en ASW como tampón. Estos resultados muestran una disminución perceptible de la actividad para la mayor parte de enzimas proteasa (tabla 5 y figura 9).

Tabla 5: Actividad catalítica de proteasas en tampón alcalino, ASW y tras tratamiento mediante xileno.

Enzimas	**Actividad, µmol min^{-1} mg^{-1}**		
	Tampón	**ASW**	**Xileno**
CLEA de *B. subtilis*	30,7	13,4	14,8
CLEA de *B. lentus*	395,8	49,6	38,4
CLEA de *B. licheniformis*	77,4	49,3	52,8
CLEA de *B. clausii*	167,6	36,3	48,5
subtilisina	2745,8	253,0	234,2

Se cree que la ausencia de iones de Ca desestabiliza las estructuras proteicas, lo que afecta a su rendimiento catalítico.

Los catalizadores mostraron diferente sensibilidad en ASW, en particular, los CLEA de *B. subtilis* y *B. licheniformis* demostraron ser más eficaces que los otros CLEA en la conservación de su actividad en ASW en comparación con su actividad en el tampón (figura 9).

También se analizaron los CLEA para determinar su tolerancia a xileno, que es un componente mayoritario de la pintura. Se incubaron los catalizadores en xileno de calidad técnica durante 24 horas. Tras el secado completo del xileno, se dispersaron los catalizadores en ASW y se midió la actividad catalítica. Se encontró que el xileno no afectaba al rendimiento catalítico de la mayor parte de los catalizadores. Sólo los CLEA de *B. lentus* presentaron una actividad reducida (aproximadamente el 5%). Sin embargo, para CLEA de *B. licheniformis* se observó un aumento en el rendimiento catalítico. Un posible motivo de esto es que el xileno puede disolver pequeñas impurezas orgánicas que se han absorbido sobre la superficie de la proteína durante la producción del catalizador y que pueden inhibir parcialmente el rendimiento de la enzima.

Por tanto, la mayor parte de las proteasas son tolerantes a la presencia de xileno y conservan cierta actividad. Sin embargo, la mayor parte de los CLEA de proteasa tienen mejor estabilidad en ASW que en xileno, aunque se observó una pérdida mínima de actividad catalítica para CLEA de *B. licheniformis.* El valor absoluto de la actividad catalítica fue el mayor para la subtilisina no modificada. Sin embargo, el uso de enzima no modificada en la pintura puede ser problemático. El pequeño tamaño del catalizador permitirá una rápida lixiviación de la enzima desde la

superficie pintada y, por tanto, dará como resultado una rápida disminución en las propiedades antiincrustación de la pintura con el tiempo.

Para estudiar esto, se dispersaron todos los catalizadores en pintura marina. Se aplicó la pintura en películas y se secaron. Tras el secado, se sumergieron las películas en ASW y se almacenaron a temperatura ambiente. Se realizó el ensayo catalítico en tampón. Se presentan los resultados de la actividad enzimática restante por los catalizadores en las figuras 10 y 11. Tal como puede observarse a partir de la figura 10, la mayor parte de los CLEA conserva un alto nivel de la actividad inicial catalítica, que es similar a los niveles de actividad catalítica mostrados en la tabla 5. Sin embargo, la subtilisina perdió rápidamente más del 50% de la actividad catalítica notificada en la tabla 5.

El perfil de estabilidad catalítica para subtilisina muestra que esta enzima perdió casi el 90% de su actividad catalítica a lo largo del transcurso del estudio. En cambio, los perfiles catalíticos para los CLEA son inusuales. Se observó que la actividad catalítica de todos los CLEA aumentaba durante el periodo estudiado. Éste fue el caso especialmente para la enzima de *B. licheniformis* que se observó que aumentaba su actividad catalítica en más del 900% durante el periodo estudiado.

Una posible explicación es que, durante el almacenamiento en ASW, la superficie de pintura secada se vuelve más hidratada, lo que conduce a un aumento en el acceso de la enzima a la superficie y, por tanto, a un aumento en la actividad catalítica total. Se muestra el esquema principal para este procedimiento en la figura 12. Tal como puede observarse a partir del esquema, inicialmente, a t_0, sólo 1/3 del catalizador es accesible para la reacción catalítica, luego, a t_1, cuando aumenta el nivel de hidratación, 2/3 del catalizador es accesible. Finalmente, a t_3, todo el catalizador está presente todavía en la pintura y tiene acceso a la superficie. Tal como puede observarse a partir del esquema, para hacer posible este procedimiento, el catalizador debe tener un tamaño mayor que el grosor de la capa que está hidratándose, de lo contrario, es probable que el catalizador se lixivie fuera de la superficie. Esta hipótesis explicar que para los CLEA el efecto de la hidratación de la capa es positivo mientras que para moléculas individuales de subtilisina es negativo. De los CLEA sometidos a prueba, parece que los CLEA de *B. licheniformis* son los de mayor tamaño, que los de *B. lentus* y *B. clausii* son de tamaño similar y que los CLEA de *B subtilis* son los más pequeños.

Para demostrar este concepto, se han realizado micrografías de MEB de los CLEA. Se presentan las imágenes en la figura 13 (B. *subtilis* (a), *B. lentus* (b), *B. licheniformis* (c) y *B. clausii* (d)). Tal como puede observarse a partir de la figura, puede estimarse el tamaño de las partículas tal como sigue: *B. subtilis* - 125 x 50 nm^2, *B. lentus* - 125 x 125 nm^2, *B. licheniformis* - 250 x 250 nm^2 y *B. clausii* - 250 x 125 nm^2. Por tanto, los CLEA de *B. licheniformis* tienen el tamaño máximo y los de *B. subtilis* son los más pequeños, lo que se correlaciona muy bien con los datos de rendimiento catalítico en pintura secada.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y el sistema descritos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas.

Lista de secuencias

<110> DANISCO A/S

<120> Composición

<130> P036124WO

<150> Documento GB 0901966.2
<151> 05-02-2009

<150> Documento US 61/150125
<151> 05-02-2009

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 275
<212> PRT
<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 1

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                  10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
        35                  40                  45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
    50                  55                  60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65                  70                  75                  80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
                165                 170                 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
            180                 185                 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

Leu Pro Gly Asn Lys Leu Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
    210                 215                 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225                 230                 235                 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
                245                 250                 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270

Ala Ala Gln
        275
```

REIVINDICACIONES

1. Composición antiincrustación que comprende:

(i) un material de recubrimiento de superficie, y

(ii) un cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado en el que la enzima se reticula con un agente de reticulación multifuncional seleccionado de quitosano o un agente de reticulación multifuncional de la siguiente estructura:

A-L-B

en la que:

A y B son grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído, imida, cianato, isocianato y mezclas de los mismos,

L es un grupo de unión seleccionado de alquileno y dextrano.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la enzima se selecciona de hidrolasas, oxidorreductasas, transferasas, liasas e isomerasas.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la enzima se selecciona de una proteasa, hexosa oxidasa, glucosa oxidasa y alcohol deshidrogenasa (ADH).

4. Composición según la reivindicación 3, en la que la proteasa es una subtilisina.

5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es una pintura a base de aceite.

6. Composición según la reivindicación 5, en la que el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado se seca antes de añadirse a la pintura a base de aceite.

7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un sustrato en el que el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado genera un compuesto antiincrustante cuando actúa sobre el sustrato.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además una primera enzima y un primer sustrato, en la que la acción de la primera enzima sobre el primer sustrato proporciona un segundo sustrato; y en la que el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado genera un compuesto antiincrustante cuando actúa sobre el segundo sustrato.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el material de recubrimiento de superficie comprende componentes seleccionados de resinas de poli(cloruro de vinilo) en un sistema a base de disolventes, cauchos clorados en un sistema a base de disolventes, resinas acrílicas y resinas de metacrilato en sistemas acuosos o a base de disolventes, sistemas de copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo como dispersiones acuosas o sistemas a base de disolventes, poli(vinil metil éter), copolímeros de butadieno tales como cauchos de butadieno-estireno, cauchos de butadieno-acrilonitrilo y cauchos de butadieno-estireno-acrilonitrilo, aceites secantes tales como aceite de linaza, resinas alquídicas, asfalto, resinas epoxídicas, resinas de uretano, resinas de poliéster, resinas fenólicas, colofonia (natural), derivados de colofonia, colofonia desproporcionada, colofonia parcialmente polimerizada, colofonia hidrogenada, gomorresina, gomorresina desproporcionada, sistemas de aglutinantes en dispersión no acuosa, sistemas de aglutinantes de acrilato sililados, sistemas de aglutinantes de acrilato de metal, derivados y mezclas de los mismos.

10. Proceso para la preparación de una composición antiincrustación, que comprende las etapas de:

(a) preparar un cristal enzimático o un agregado enzimático y hacer reaccionar el cristal enzimático o agregado enzimático con un agente de reticulación multifuncional seleccionado de quitosano o un agente de reticulación multifuncional de la siguiente estructura:

A-L-B

en la que:

A y B son grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído, imida, cianato, isocianato y mezclas de los mismos,

L es un grupo de unión seleccionado de alquileno y dextrano;

para producir un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado;

(b) opcionalmente secar el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado;

(c) opcionalmente aumentar la hidrofobicidad de la superficie del cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado; y

(d) añadir el cristal enzimático reticulado o agregado enzimático reticulado a un material de recubrimiento de superficie para producir una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado en el que la enzima se reticula con un agente de reticulación multifuncional seleccionado de quitosano o un agente de reticulación multifuncional de la siguiente estructura:

A-L-B

en la que:

A y B son grupos funcionales seleccionados de alcohol, aldehído, imida, cianato, isocianato y mezclas de los mismos,

L es un grupo de unión seleccionado de alquileno y dextrano;

para inhibir la incrustación.

12. Uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado según la reivindicación 11, para inhibir la incrustación provocada por la formación de biopelícula.

13. Uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado según la reivindicación 11 ó 12, en el que la enzima se selecciona de hidrolasas, oxidorreductasas, transferasas, liasas e isomerasas.

14. Uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la enzima se selecciona de una proteasa, hexosa oxidasa, glucosa oxidasa y alcohol deshidrogenasa (ADH).

15. Uso de un cristal enzimático reticulado o un agregado enzimático reticulado según la reivindicación 14, en el que la proteasa es una subtilisina.

16. Método para inhibir la formación de biopelícula sobre un artículo que comprende poner en contacto el artículo con una cantidad eficaz de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

17. Método para inhibir la formación de biopelícula sobre un artículo que comprende aplicar al artículo una cantidad eficaz de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

18. Artículo dotado de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

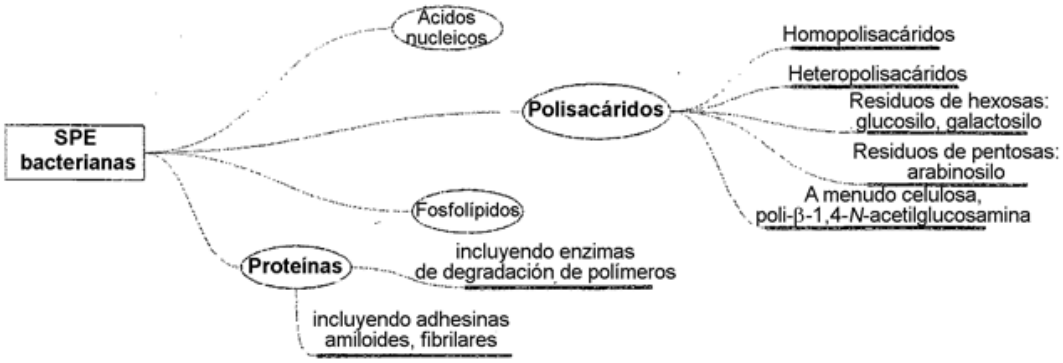


Figura 1

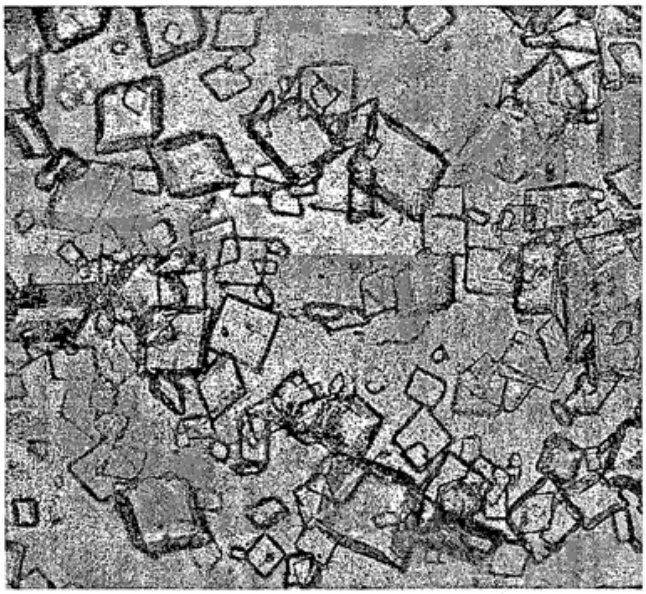


Figura 2

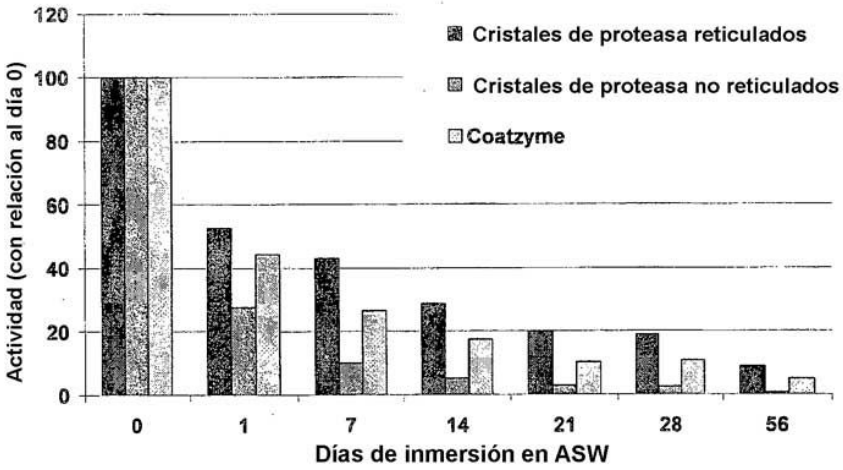

120
100
80
60
40
20
0
Actividad (con relación al día 0)
Cristales de proteasa reticulados
Cristales de proteasa no reticulados
Coatzyme
0
1
7
14
21
28
56
Días de inmersión en ASW

Figura 3

Figura 4

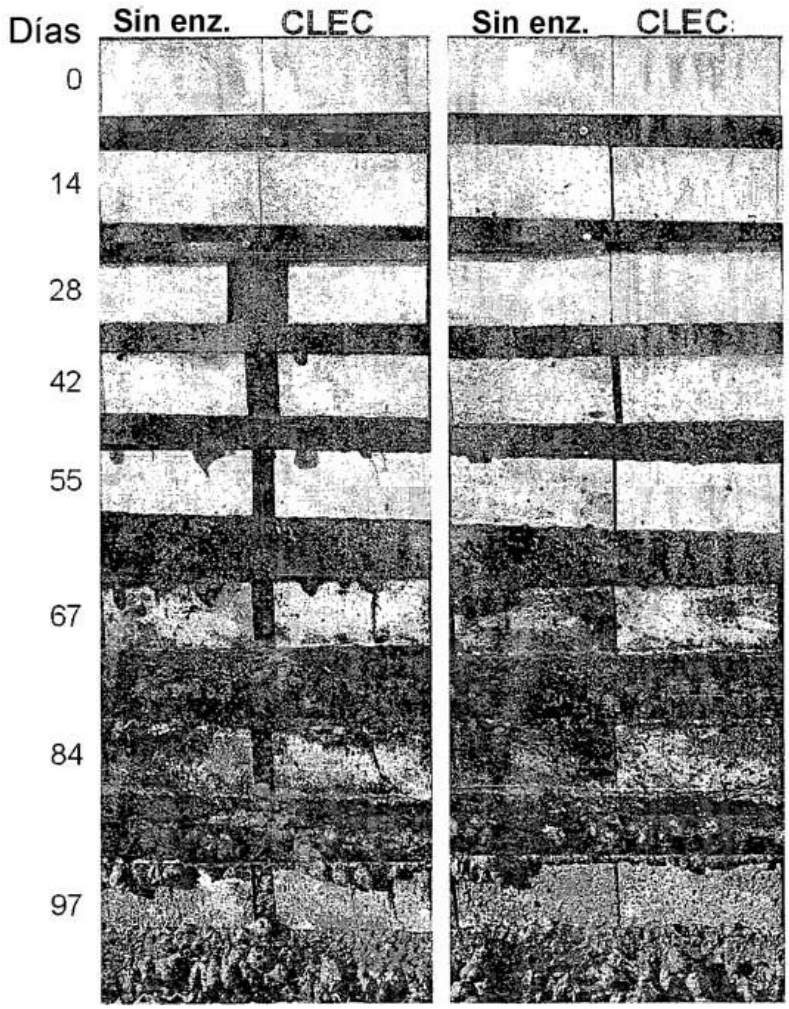


Figura 5
SEQ ID NO. 1

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
50 55 60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65 70 75 80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85 90 95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
130 135 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145 150 155 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
165 170 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205

Leu Pro Gly Asn Lys Leu Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225 230 235 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270

Ala Ala Gln
275

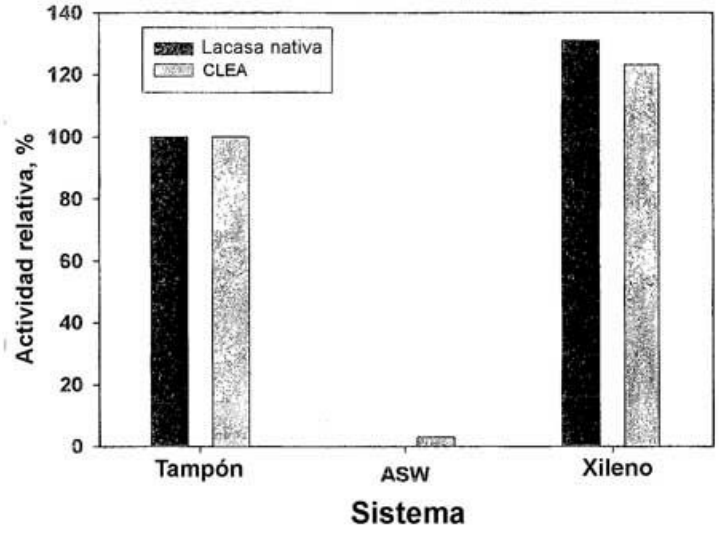


Figura 6

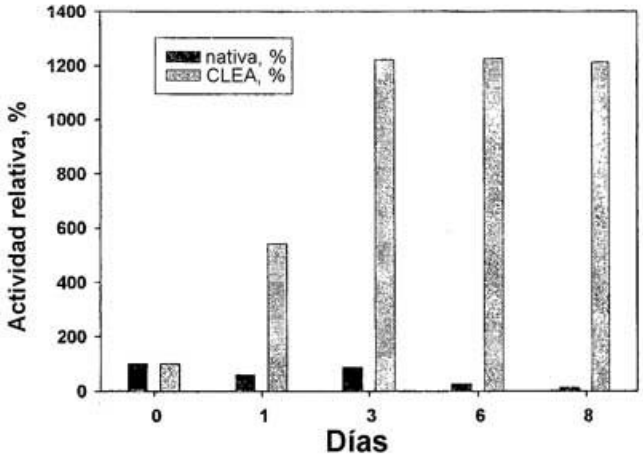


Figura 7

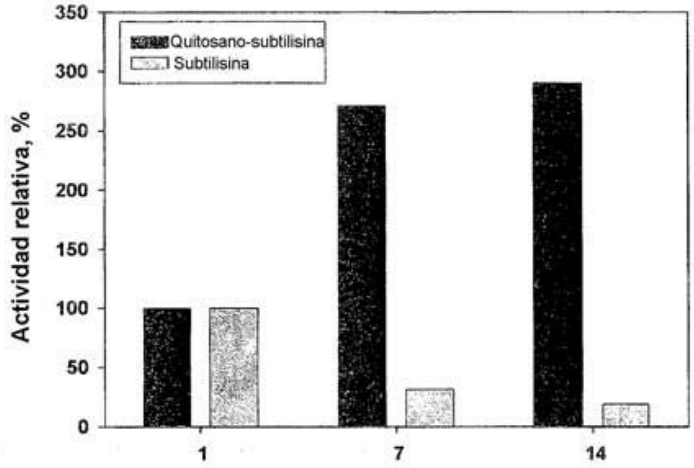


Figura 8

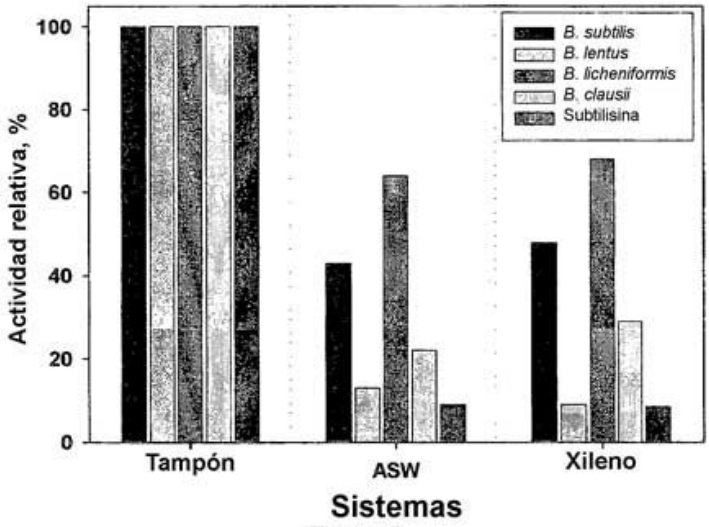


Figura 9

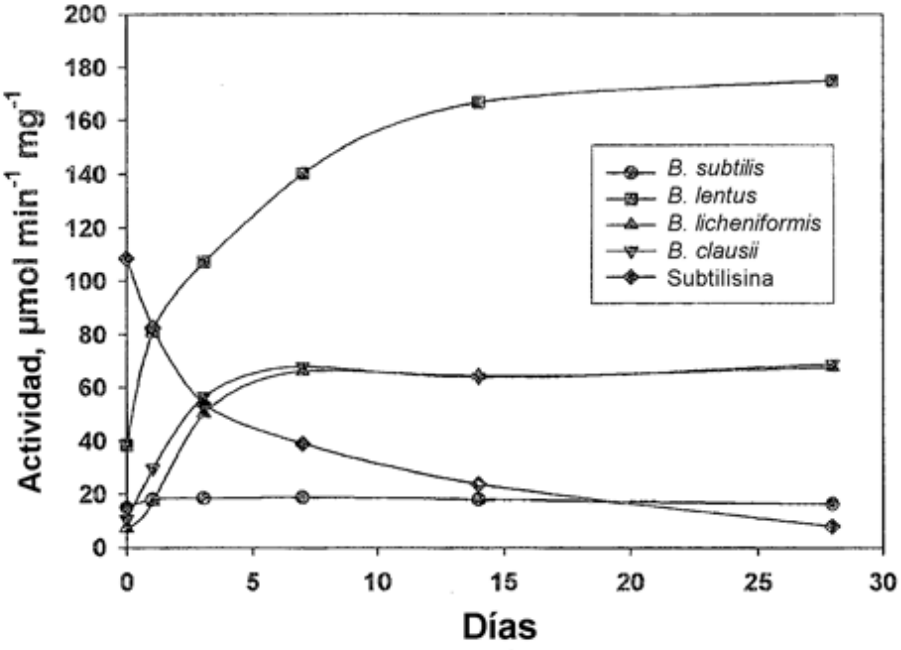


Figura 10

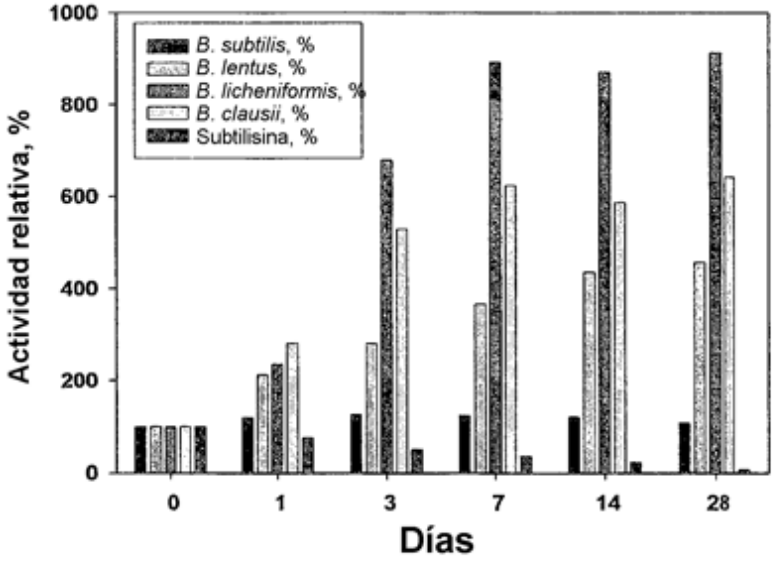


Figura 11

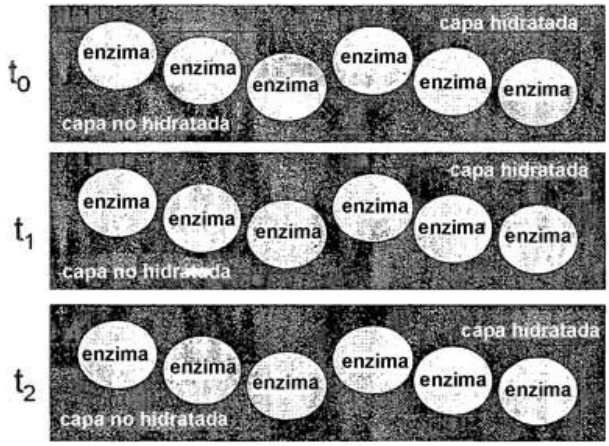


Figura 12

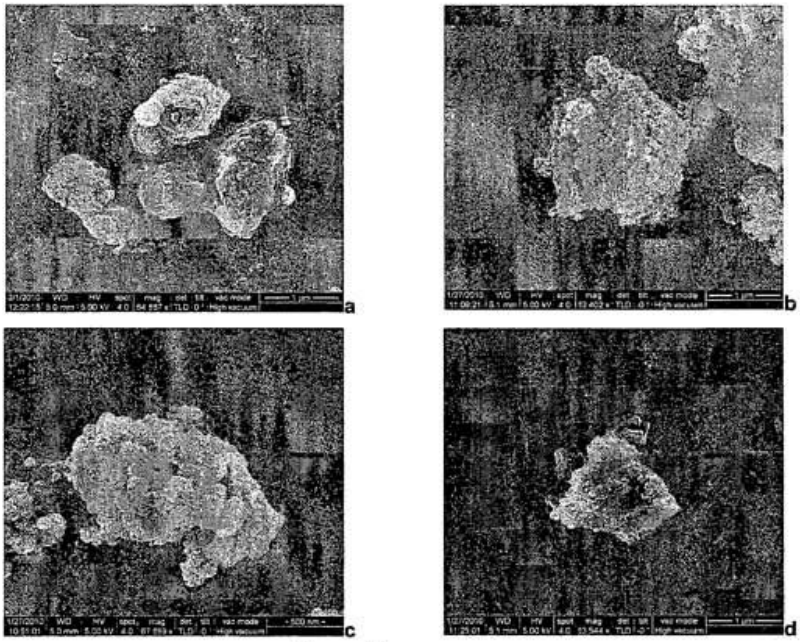


Figura 13.