

**EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE ENZIMAS PROTEASAS EN UN
DETERGENTE LÍQUIDO PARA LA REMOCIÓN DE MANCHAS DE SANGRE,
APLICANDO LA METODOLOGÍA DE DISEÑO DE PRODUCTOS QUÍMICOS.**

**JOAN SEBASTIAN GARCIA ACEVEDO
LUISA FERNANDA MONTOYA NIÑO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE ENZIMAS PROTEASAS EN UN
DETERGENTE LÍQUIDO PARA LA REMOCIÓN DE MANCHAS DE SANGRE,
APLICANDO LA METODOLOGÍA DE DISEÑO DE PRODUCTOS QUÍMICOS.**

**JOAN SEBASTIAN GARCIA ACEVEDO
LUISA FERNANDA MONTOYA NIÑO**

**Trabajo integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
Wilfred Fabián Ballesteros Ochoa
Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

Nota de aceptación:

Ingeniera Elizabeth Torres
Presidente del Jurado

Ingeniero Luis Reyes
Jurado 1

Microbióloga Diana Morales
Jurado 2

Bogotá D.C., marzo de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. Julio César Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo De Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Agradecido con Dios por permitirme alcanzar esta invaluable meta, quiero dedicar este trabajo, en primer lugar, a mis padres, por ser un ejemplo de vida, por su amor, por su absoluto e incondicional respaldo en todo el camino que he recorrido.

A mi Hermano, por estar ahí en todo momento, por su apoyo y por hacerme reír siempre.

A Alicia Sánchez, mi abuela, que en vida me brindó todo su amor y hoy desde el cielo, me sigue acompañando.

A Cecita, por cobijarme con su amor de abuela, por sus oraciones y su apoyo.

A todas mis Tías, especialmente a mi Tía Marta, a mi Tía Nelsy, a mi Tía Edy y mi Tía Ina, por ser mis segundas madres, por su apoyo y respaldo.

A todos mis Tíos, en especial a mi Tíos Henry y Juan Ramón por su apoyo.

A Mauro, por su apoyo y su valioso consejo que me permitió tomar este afortunado rumbo.

A Andrea, por su apoyo y por compartirme sus libros y apuntes para iniciar esta carrera.

A todos mis primos, a la Negrita, al Flaco, a Dani, a Cesarión, a Leo, a Karimagua, gracias por su cariño.

A todos ustedes, por ser parte de este trabajo y por ser parte de mi vida...

¡Infinitas Gracias!

Sebastián García Acevedo

DEDICATORIA

Dedico este, mi primer proyecto de vida hecho realidad, especialmente a Dios por acompañarme e iluminar mi vida en todo momento, gracias por darme fortaleza y sabiduría para seguir adelante y nunca decaer.

A mi querida mami, a ti, por ser la persona más importante en mi vida, por ser ese ángel que me brinda todo sin pedir nada a cambio, eres y serás para mí un ejemplo a seguir por siempre. Gracias por tu infinita paciencia y por darme la mejor herencia de todas, el estudio. Sin ti, esto no habría sido posible.

*A mi papá que siempre me ha inculcado la rectitud y responsabilidad de las cosas,
A mí querida hermana Laura por apoyarme siempre en mis ideas locas,
A mis dos queridos hermanos; Sebastián y Nicolás a quienes tanto quiero.
A mi abuelita Flor por ser un gran ejemplo de vida.
A mi abuelo Belisario y mi abuela Isabel, porque me han dado su bendición desde el cielo.*

Gracias desde lo más profundo de mi alma por compartir este sueño materializado.

Con todo mi cariño y amor.

LUISA MONTOYA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Fabián Ballesteros, Ingeniero Químico. Por su gran apoyo, comprensión, seguimiento y supervisión continúa de este proyecto, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos meses.

Elizabeth Torres Gámez, Ingeniera Química. Por su interés y orientación en el desarrollo del proyecto.

Carolina Montefrío Pérez, Ingeniera Química. Por su disposición y su contribución intelectual para darle un mejor enfoque a la realización de este proyecto.

Geraldine Pineda, Auxiliar de laboratorio. Por compartir su experiencia y su compañía que fueron de gran aporte durante el proceso de experimentación.

Johann Faccelo Osma, Doctor en Ingeniería Química. Por su indispensable y desinteresada ayuda, por su paciencia, motivación y sabiduría para la culminación de este proyecto de investigación.

Tatiana Acevedo Vergara, Enfermera Jefe. Por su valiosa y desinteresada ayuda en el desarrollo de este proyecto.

Dani Ricardo Acevedo, Ingeniero Civil. Por su importante aporte a este proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	20
1 MARCO TEORICO	21
1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS	22
1.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	23
1.2.1 Factores que influyen en la actividad enzimática	24
1.3 EL MERCADO MUNDIAL DE LAS ENZIMAS	26
1.4 DETERGENTES	27
1.4.1 COMPOSICION DE LOS DETERGENTES	27
1.4.2 APLICACIÓN DE PROTEASAS COMO ADITIVOS PARA DETERGENTES	31
1.5 PROPIEDADES DE LOS DETERGENTES	32
1.5.1 DETERGENCIA	32
1.5.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACCIÓN DE LOS DETERGENTES	34
1.6 METODOLOGÍA DE DISEÑO DE PRODUCTOS QUÍMICOS	34
2 METODOLOGÍA	36
2.1 EQUIPOS	37
2.2 MATERIAS PRIMAS	37
2.3 PREPARACIÓN DE FORMULACIONES	41
2.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	41
2.5 PRUEBAS DE LAVADO	42
2.6 PRUEBAS DE ESTABILIDAD	42
2.7 DETERMINACIÓN DE PERFILES DE VISCOSIDAD	42
2.8 FOTOMICROGRAFIA	43
2.9 PRUEBA COMPARATIVA POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	43
3 EXPERIMENTACIÓN	44
3.1 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS	44
3.1.1 Selección del surfactante aniónico	44
3.1.2 Pruebas de lavado primer grupo de formulaciones	46
3.1.3 Preparación del segundo grupo de formulaciones	49
3.1.4 Pruebas de lavado segundo grupo de formulaciones	51
3.1.5 Pruebas de estabilidad	53
3.1.6 Perfiles reológicos	55
3.1.7 Fotomicrografía	56
3.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	57
3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	59
3.3.1 Preparación de formulaciones experimentales	59
3.3.2 Pruebas de lavado formulaciones experimentales	60

3.3.3 Prueba de estabilidad formulaciones experimentales	63
3.3.4 Perfiles reológicos	65
3.3.5 Adición y variación de las cantidades enzimáticas en el detergente	66
3.3.6 Comparación del producto con otros detergentes	69
3.3.7 Análisis por espectrofotometría	72
4. ESPECIFICACIONES DEL PROCESO PRODUCTIVO DEL DETERGENTE	73
4.1 MATERIAS PRIMAS	73
4.2 TRANSFORMACIÓN	74
4.2.1 Equipos	74
4.2.2 Tiempos de agitación	74
4.2.3 Control de Calidad	74
5. ESTIMACIÓN DE COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL DETERGENTE A NIVEL DE LABORATORIO	76
6. CONCLUSIONES	78
7. RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	83

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Relación de los valores de HBL de los surfactantes con su aplicación.	29
Tabla 2. Surfactantes seleccionados para conformar la matriz de sustancias activas.	39
Tabla 3. Formulación detergente para el desarrollo de la primera parte de la experimentación.	44
Tabla 4. Primer grupo de formulaciones, variando los surfactantes aniónicos y las enzimas.	45
Tabla 5. Tiempos de agitación intermedios de los componentes en la formulación.	45
Tabla 6. pH inicial y final del primer grupo de formulaciones preparadas.	46
Tabla 7. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para el primer grupo de formulaciones.	47
Tabla 8. Resultados del cálculo de los porcentajes de remoción para el primer grupo de formulaciones.	47
Tabla 9. Formulación detergente para el desarrollo del segundo grupo.	50
Tabla 10. Segundo grupo de formulaciones, variando los surfactantes no iónicos.	50
Tabla 11. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para el segundo grupo de formulaciones.	51
Tabla 12. Resultados del cálculo de los porcentajes de remoción para el segundo grupo de formulaciones.	51
Tabla 13. Componentes y composiciones ingresados en el software.	58
Tabla 14. Formulaciones resultantes tras aplicar el diseño de experimentos.	59
Tabla 15. Composición de las formulaciones experimentales.	60
Tabla 16. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado con las formulaciones experimentales.	60
Tabla 17. Porcentajes de remoción calculados para las formulaciones experimentales.	61
Tabla 18. Formulaciones detergentes variando la concentración de enzima.	66
Tabla 19. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para las formulaciones con diferentes concentraciones de enzima.	66

Tabla 20. Porcentajes de remoción calculados para las formulaciones enzimáticas.	67
Tabla 21. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado con los detergentes de comparación.	69
Tabla 22. Porcentajes de remoción calculados para los detergentes de comparación.	70
Tabla 23. Resultados de la absorbancia a 480 nm.	72
Tabla 24. Formulación del detergente enzimático.	73
Tabla 25. Orden de la incorporación de los componentes y el tiempo de agitación.	74
Tabla 26. Costos de materias primas en función de las cantidades requeridas por el detergente.	76
Tabla 27. Costos energéticos para la producción del detergente.	77
Tabla 28. Ensayos propuestos por el método de vértices extremos.	88

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Tipos de enzimas y porcentajes de aplicación industrial.	26
Gráfica 2. Porcentaje de remoción del primer grupo de formulaciones. Las barras de error representan la desviación del valor de la media, basado en los duplicados de las muestras totales.	48
Gráfica 3. Porcentaje de remoción del segundo grupo de formulaciones. Las barras de error representan la desviación del valor de la media, basado en los duplicados de las muestras totales.	52
Gráfica 4. Perfil reológico del primer y segundo grupo de formulaciones.	55
Gráfica 5. Resultados gráficos de la remoción de las formulaciones experimentales.	62
Gráfica 6. Perfiles reológicos de las formulaciones experimentales.	65
Gráfica 7. Resultados gráficos de la remoción de las formulaciones enzimáticas.	67
Gráfica 8. Resultados gráficos de la remoción de los detergentes de comparación.	70

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Composición de un detergente líquido.	28
Figura 2. Mecanismo general de la detergencia.	33
Figura 3. Aplicación de la metodología de diseño de productos químicos.	36
Figura 4. Actividad enzimática de las enzimas <i>Purafect® Prime L</i> (1) y <i>Effectenz™ P100</i> (2) en función del pH.	38
Figura 5. Imágenes a contraluz de las muestras lavadas con las formulaciones con enzima pH 8 y pH 10.	49
Figura 6. Imágenes a contraluz de las muestras lavadas con las formulaciones del segundo grupo	53
Figura 7. Fotomicrografía a la formulación detergente con lente 40x.	56
Figura 8. Fotomicrografía a la solución enzimática con lente 100x.	57
Figura 9. Comparación de los resultados a contraluz entre la formulación experimental 1 y la formulación experimental 11.	63
Figura 10. Comparación de las formulaciones E 0.1 y E 2.0 a contraluz.	68
Figura 11. Resultados a contraluz de las muestras lavadas con los detergentes de comparación.	71
Figura 12. Diagrama de bloques del proceso de producción del detergente.	75
Figura 13. Balanza Analítica.	84
Figura 14. Agitador con propela de superflujo.	84
Figura 15. Viscosímetro con eje #3.	85
Figura 16. Microscopio.	85
Figura 17. Espectrofotómetro.	86
Figura 18. Formulaciones experimentales 1, 2, 3, 4 y 5.	90
Figura 19. Formulaciones experimentales 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.	90
Figura 20. Formulaciones Detergentes con diferentes concentraciones de enzima.	90

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Clasificación de las enzimas establecida por la Unión Internacional de Bioquímica.	24
Cuadro 2. Componentes usados en la preparación de las formulaciones.	41
Cuadro 3. Seguimiento a la estabilidad de formulaciones preparadas.	55
Cuadro 4. Seguimiento a 30 días de la estabilidad de las formulaciones experimentales.	65
Cuadro 5. Productos disponibles para ser comparados.	70

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Equipos de laboratorio	85
Anexo B. Elaboración de formulaciones	88
Anexo C. Formulaciones del diseño de experimentos	89
Anexo D. Formulaciones experimentales	91
Anexo E. Realización pruebas de lavado	92
Anexo F. Ficha técnica enzima neutro-alcalina	93
Anexo G. Ficha técnica enzima alcalina	95

GLOSARIO

ADITIVO: sustancia que modifica las características físicas o químicas de una sustancia base o mezcla, para potencializar o atenuar las propiedades de esta.

DETERGENCIA: proceso de eliminación de las sustancias indeseadas adheridas a objetos o a la piel de los seres vivos¹.

DETERGENTE: producto químico usado en la eliminación de sustancias de diversas características, generalmente materia orgánica, que se encuentren adheridas en superficies sólidas a través de un disolvente, usualmente agua, en una operación de lavado².

EMULSIÓN: mezcla de líquidos inmiscibles entre sí, en donde uno de los líquidos, se encuentra en mayor proporción (Fase continua) y el otro en menor proporción (Fase Dispersa), los cuales se unen por medio de un agente externo (agente emulsionante), el cual interactúa a nivel molecular con las dos fases, uniéndolas en una fase estable, por medio de la formación de micelas.

ENZIMA: catalizador de origen biológico y naturaleza proteica, que interviene en las reacciones acelerando su velocidad y favoreciendo las transformaciones bioquímicas.

SUSTRATO: especie química o molécula, considerada como reactivo en reacciones biológicas, que son catalizadas por enzimas.

TENSOACTIVO: sustancia química la cual, su estructura está conformada por una parte hidrofílica y otra parte hidrófoba que, al estar disuelta en un líquido, disminuye su tensión superficial.

¹ SILVA, Madeleine. Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido. Tesis de grado. Loja, Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica. Departamento de Bioquímica Farmacéutica. 2015. p 7.

² *Ibíd.*, p 7

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la incorporación de enzimas en la formulación de un detergente líquido para la remoción de manchas de sangre en fibras textiles de algodón-poliéster aplicando la metodología de diseño de productos químicos. Para tal efecto, se realizó una pre-experimentación donde se prepararon formulaciones detergentes, variando tres clases de tensoactivos aniónicos y cinco clases de tensoactivos no iónicos, todos disponibles comercialmente. A cada producto obtenido del primer grupo de tensoactivos aniónicos, se le incorporó dos (2) tipos de enzimas proteasas; una enzima tipo neutra-alcalina (*Purafect® Prime L*) y con pH en el rango de 7 a 8 y otra enzima de tipo alcalina (*Effectenz™ P100*) con rango de pH de 9 a 11; al grupo de los tensoactivos no iónicos se le incorporó únicamente la enzima neutra-alcalina, pues presentó el porcentaje de remoción más alto de la mancha en las muestras, además de presentar mejores resultados visuales. Posteriormente, se determinó el perfil de viscosidad, análisis de estabilidad de las formulaciones seguido de pruebas de lavado en las fibras contaminadas con sangre. Para la consecución de la mejor formulación, se hace el planteamiento de un diseño de experimentos, siguiendo el método propuesto por McLean y Anderson, obteniéndose 14 formulaciones, en donde en cada una se varía la concentración de los diferentes componentes, para ser evaluadas mediante pruebas de lavado.

Del presente estudio se concluyó que la formulación preparada con los tensoactivos SA-10, SA-20 y enzima neutra, obtuvo los mejores resultados en remoción de manchas de sangre en las muestras evaluadas, llevando a cabo una comparación con detergentes de uso doméstico y hospitalario.

Palabras clave: detergente, enzimas, proteasas, sangre, tensoactivo.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas en los detergentes han tenido un rápido crecimiento en respuesta a la búsqueda de mejoras en este mercado. Inicialmente este gran crecimiento llegó a través de la participación de las enzimas proteasas; quienes han promovido activamente en gran parte su uso en formulaciones detergentes. Por ejemplo, en el lavado de ropa, las enzimas pueden realizar el trabajo “sucio” removiendo manchas complejas gracias a su alta selectividad, que puede traer como consecuencia un ahorro energético y económico.

Industrias Saint Germain Ltda., recientemente determinó que un importante sector del mercado requería detergentes de uso institucional, como lo son las clínicas y hospitales de Bogotá; debido a que los textiles involucrados en la prestación de sus diversos servicios, se ven negativamente afectados cuando estos se manchan de sustancias de origen biológico, específicamente sangre. Es por esto, que la empresa tomó la decisión de evaluar la incorporación de enzimas en un detergente líquido, cuya formulación no afecte la calidad de la fibra textil de algodón poliéster y remueva en gran totalidad la mancha de sangre, donde el único enfoque fiable a evaluar fue la eficacia de la enzima, llevando a cabo una evaluación de desempeño de lavado.

Para la incorporación de las enzimas proteasas se tuvo en cuenta su estabilización con materias primas que no causaran su desnaturalización, puesto que el éxito de esta incorporación se debe al manejo seguro de los preparados enzimáticos. Para esto se tuvo en cuenta estabilizar la enzima aparte con un hidrótopo, y utilizar surfactantes que combinados con un secuestrante y una sustancia aportante de iones cofactores no representara una desestabilización de ésta en el proceso. Adicionalmente, se tuvo en cuenta el medio al que fue incorporada la enzima, controlando el pH para no inactivarla y así poder identificar los factores que pudieron afectar en el desempeño del producto.

Este trabajo permitió corroborar la importancia que tienen las enzimas en el mercado de los detergentes, mediante la metodología de diseño de productos químicos, pues la expectativa de la eficiencia en la remoción de manchas sin necesidad de tratamientos especiales va en aumento. Por otra parte, con el crecimiento en el costo de las prendas, los consumidores quieren ver un uso prolongado de la prenda, por lo tanto, se esperarían detergentes menos agresivos; como los que operan a un pH más bajo, fácil uso y manipulación segura.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la incorporación de enzimas proteasas en la formulación de un detergente líquido para la remoción de manchas de sangre en fibras textiles de algodón poliéster a escala laboratorio en Saint Germain Ltda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar la composición del detergente que mejor se adecue al funcionamiento de las enzimas.
2. Seleccionar la enzima que presente mayor eficiencia en la remoción de manchas de sangre en el detergente formulado, mediante un desarrollo experimental.
3. Determinar las especificaciones técnicas del proceso de producción del detergente enzimático.
4. Estimar los costos de producción del detergente enzimático a nivel laboratorio.

1. MARCO TEORICO

En la industria de los detergentes, se vienen desarrollando nuevos avances para hacerlos más eficientes en la remoción de sustancias de mayor complejidad, lo que implica la búsqueda de nuevos componentes que puedan efectuar esta función. Es así, como las enzimas llegan a esta importante industria, puesto que éstas tienen la capacidad de actuar sobre sustancias específicas, llegándolas a degradar y facilitar su remoción. El rendimiento de las enzimas en los detergentes está influenciado por factores como el pH de la solución de detergente, la fuerza iónica, la temperatura y tiempo de lavado, la composición del detergente o la manipulación mecánica. Por otro lado, las enzimas han de tener una especificidad de sustrato lo suficientemente amplia, porque la carga media de suciedad y las manchas que contienen los sustratos pueden presentarse de multitud de formas para las cuales la actividad enzimática ha de ser eficiente. Además, la eliminación total de las manchas y de la suciedad requiere la acción conjunta de enzimas, agitación mecánica y componentes químicos del detergente.

En la actualidad, es posible encontrar en el mercado de aditivos para detergentes, diversos tipos de enzimas, como son las proteasas, amilasas, celulasas y lipasas; las cuales requieren de condiciones estrictas de temperatura, pH, concentración e incluso, compatibilidad con los otros compuestos de la formulación para lograr una máxima actividad dentro del detergente. Teniendo en cuenta estos atributos, se logra resaltar en las enzimas, su capacidad de tener altos niveles de actividad y poderse mantener estables a temperaturas moderadamente altas (20 a 60 °C) y a pH alcalinos (9,0 a 12,0), las cuales se ajustan a las condiciones de lavado a las que se enfrentan los detergentes comerciales actualmente, además de presentar estabilidad con otros agentes y aditivos comúnmente usados en la composición de los detergentes (agentes oxidantes, quelantes, surfactantes, blanqueadores, etc.); y la estabilidad a lo largo de la vida media de los detergentes que las contienen. En el momento en que las enzimas interactúan con determinados componentes de la formación detergente, estos pueden influir negativamente la actividad y estabilidad enzimática, haciendo que estos parámetros no alcancen los niveles esperados y por el contrario, disminuyéndolos, puesto que las enzimas en condiciones controladas de laboratorio son bio-activas, pero al llevar su aplicación a condiciones de aplicación real, presentan estos comportamientos de limitación de estabilidad y actividad, razón por la cual, no todas las enzimas que presentan potencial uso para la degradación o remoción de manchas pueden usarse como aditivos en productos detergentes³.

³ Iván, El Papel de las Enzimas en los Detergentes, 2012, <http://www.ingenieriaquimica.net/articulos/299-el-papel-de-las-enzimas-en-los-detergentes> [Consulta: 13 de Septiembre de 2016]

1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

Las enzimas como sustancias de origen proteico, varían su función de acuerdo a diversos factores, como lo son la disposición de su sitio activo o el sustrato específico que actúe sobre ellas, de ahí la infinita variedad que pueden existir. Por tal razón, fue necesario establecer un criterio para agrupar esta inmensa cantidad, de acuerdo a funciones generales que tienen en común, es por esto que, en el año de 1964, la comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica estableció una primera clasificación de las enzimas de acuerdo a la su función dentro de las reacciones químicas que catalizan, además de uniformar la nomenclatura de estas. Dicha clasificación, que contempla 6 grupos, se resume en el cuadro 1⁴.

Cuadro 1. Clasificación de las enzimas establecida por la Unión Internacional de Bioquímica.

Tipo de Enzima	Función
1. Oxidorreductasas	Catalizan una amplia variedad de reacciones de óxido-reducción, empleando coenzimas, tales como NAD ⁺ y NADP ⁺ , como aceptor de hidrógeno. Este grupo incluye las enzimas denominadas comúnmente como deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, oxigenasas, hidroxilasas y catalasas.
2. Transferasas	Catalizan varios tipos de transferencia de grupos de una molécula a otra (transferencia de grupos amino, carboxilo, carbonilo, metilo, glicosilo, acilo, o fosforilo). Ej.: aminotransferasas (transaminasas).
3. Hidrolasas	Catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como C=O, C-N, C-C. Sus nombres comunes se forman añadiendo el sufijo -asa al nombre de sustrato. Ej.: lipasas, peptidasas, etc.
4. Liasas	También catalizan la ruptura de enlaces (C-C, C-S y algunos C-N, excluyendo enlaces peptídicos), pero no por hidrólisis. Ej.: decarboxilasas, citrato-liasa, deshidratasas y aldolasas.

⁴ Clasificación de las enzimas Clasificación General. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. Internet:

<http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/part_e03/01.html>

Cuadro 1. (Continuación)

Tipo de Enzima	Función
5. Isomerasas	Transforman sus sustratos de una forma isomérica en otra. Ej.: Epimerasas, racemasas y mutaras.
6. Ligasas	Catalizan la formación de enlace entre C y O, S, N y otros átomos. Generalmente, la energía requerida para la formación de enlace deriva de la hidrólisis del ATP. Las sintetasas y carboxílicas están en este grupo.

1.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA⁵

Cuando se habla de una reacción química, es necesario analizar si esta es termodinámicamente favorable o no, lo cual, es posible determinarlo dependiendo de la diferencia de energía libre que haya entre los reactivos (en el contexto de las enzimas se conocen como sustratos) y los productos de la reacción. Cuando esta diferencia es negativa, se considera la reacción como espontánea, condición que no necesariamente se refiere a la velocidad con que la reacción se lleve a cabo, ni mucho menos, a que esta velocidad sea elevada, cuestión que dependen de otros factores. La velocidad de una reacción química depende de diversos factores que son, entre otros, la temperatura, ya que al aumentar la energía de los reactivos, se multiplica la interacción entre estos, aumentando la velocidad de reacción. Otro factor que afecta la velocidad, es la naturaleza y concentración de los reactivos, ya que de estos depende la energía de activación, puesto que si esta es baja, la reacción se dará con rapidez y por el contrario, si esta es alta, la velocidad de la reacción será lenta. Para que se lleve a cabo la reacción química sin participación de enzimas, es preciso que los reactivos estén en contacto, situación que implica una concentración suficiente de estos, que promueva la interacción de estas moléculas. Es así, como se define la energía de activación, puesto que es necesario que las moléculas en mención, tengan una mínima energía para que choquen entre sí, motivo por el cual, la temperatura tiene directa influencia en el equilibrio químico. Cuando se tiene presencia de enzimas en la reacción, estas se encargan de disminuir esta energía necesaria, haciendo que el (los) sustrato(s), interaccionen de manera más estable en una región específica de su basta área, conocida como *sitio activo*, aumentando considerablemente, la probabilidad de que se produzca la reacción química. En algunas circunstancias, las reacciones químicas catalizadas por enzimas, requieren la participación de coenzimas o cofactores, que permitan que la reacción, no afecte o modifique, el sitio activo de las enzimas, para que esta pueda seguir catalizando la reacción de nuevas moléculas, bajo un proceso continuo y estable.

⁵ PARDO, Luz. Talleres de Bioquímica. Universidad de América. 2014. p 60

En resumen, el mecanismo de función general de las enzimas (E) para la catálisis de sustratos (S) a productos (P), se inicia con la formación del complejo sustrato-enzima (ES) y culmina con la liberación de los productos y la regeneración de la enzima (1).



1.2.1 Factores que influyen en la actividad enzimática⁶. Las enzimas al ser sustancias catalizadoras con alta especificidad, requieren condiciones determinadas para lograr a cabalidad su función catalítica, las cuales varían de acuerdo al tipo de enzima implicada, hacen que se conviertan en variables importantes a controlar, puesto que factores como la concentración de las enzimas, la concentración del sustratos, entre otros factores ambientales, cambian radicalmente las condiciones para la funcionalidad.

1.2.1.1 Cambio en la temperatura. Todas las enzimas requieren una temperatura favorable para que funcionen correctamente. La velocidad de una reacción bioquímica, aumenta con la elevación de la temperatura. Esto se debe, a que el calor incrementa la energía cinética de las moléculas participantes, lo que produce una mayor cantidad de colisiones entre ellas. Por otra parte, se encuentra que, sobre todo, en las condiciones de baja temperatura la reacción se vuelve lenta, debido a la disminución de la cantidad de contactos entre el sustrato y la enzima. Sin embargo, las temperaturas extremas no son buenas para las enzimas. Bajo la influencia de la temperatura muy alta, la molécula de la enzima tiende a ser distorsionada, debido a que disminuye la velocidad de reacción. En otras palabras, una enzima desnaturalizada no lleva a cabo sus funciones normales.

1.2.1.2 Cambio en el valor pH. La eficiencia de una enzima está ampliamente influenciada por el valor del pH de su entorno. Esto se debe a la carga de sus componentes aminoácidos, con el cambio en el valor de pH. Cada enzima se activa en un nivel de pH específico. El valor de pH favorable para una enzima específica, en realidad depende del sistema biológico en el que se está trabajando. Cuando el valor de pH se vuelve muy alto o demasiado bajo, entonces la estructura básica de la enzima sufre un cambio (o cambios). Como resultado, el lugar activo de la enzima no se une con el sustrato de la forma adecuada y la actividad de la enzima se afecta gravemente. La enzima puede incluso dejar de funcionar por completo.

1.2.1.3 Concentración de sustrato. La concentración de sustrato, desempeña un papel importante en diversas enzimas. Obviamente, esto se debe a una mayor concentración de sustrato, lo que significa, que una mayor cantidad de moléculas de sustrato están involucradas en la actividad de la enzima. Considerando que, una baja concentración de sustrato significa, que una menor cantidad de

⁶ *Ibíd.*, p 62

moléculas estará asociada a las enzimas. Esto a su vez, reduce la actividad de la enzima. De acuerdo con el postulado de Michaelis-Menten⁷, la cual describe la cinética de una reacción enzimática y que sólo es aplicable cuando la concentración de sustrato es superior a la concentración de enzima, la velocidad de una reacción enzimática es la máxima ($V_{m\acute{a}x}$), cuando los sitios activos de la enzima se encuentran saturados con moléculas de sustrato, por lo que un aumento en la concentración de sustrato, no hará ninguna diferencia en la actividad de la enzima. El concepto de velocidad de reacción es muy importante, porque a través de este se puede determinar la concentración del sustrato que se convierte en producto en un determinado tiempo, alcanzando valores asintóticos a la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), razón por la cual no es posible determinar con exactitud los valores de concentración de sustrato en este valor, pero si ofreciendo un parámetro fundamental que puede caracterizar el comportamiento enzimático, garantizando la concentración de sustrato a la cual, la enzima alcanza la mitad de su velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}/2$).

1.2.1.4 Concentración de enzima. En cualquier reacción enzimática, la cantidad de las moléculas de sustrato que se trata es mayor, en comparación con la cantidad de las enzimas. Un aumento de la concentración de las enzimas, aumenta la actividad enzimática por la sencilla razón, de que más enzimas participan en la reacción. La velocidad de la reacción, es directamente proporcional a la cantidad de enzimas disponibles. Sin embargo, esto no quiere decir, que un aumento constante en la concentración de las enzimas dará lugar a un aumento constante de la velocidad de reacción. Más bien, una muy alta concentración de enzimas, en donde todas las moléculas de sustrato ya se utilizan, no tiene ningún impacto sobre la velocidad de reacción. Para ser más exactos, una vez, que la velocidad de reacción haya alcanzado la estabilidad, un aumento en la cantidad de enzimas no afectará a la velocidad de reacción.

1.2.1.5 Inhibidores. Como el nombre sugiere, los inhibidores son las sustancias, que tienen una tendencia de evitar las actividades de las enzimas. Los inhibidores de la enzima, interfieren con las funciones de la enzima de dos maneras diferentes. Basado en esto, se dividen en dos categorías: los inhibidores competitivos y los inhibidores no competitivos. Un inhibidor competitivo, tiene una estructura que es la misma, que la de una molécula de sustrato, y por lo que se une al centro activado de la enzima fácilmente y restringe la formación de enlace del complejo enzima-sustrato. Un inhibidor no competitivo, es el que produce el cambio (o cambios), en la forma de las enzimas por la reacción con su lugar activo. En esta condición, la molécula del sustrato, no puede unirse a la enzima y, por tanto, las actividades posteriores se bloquean.

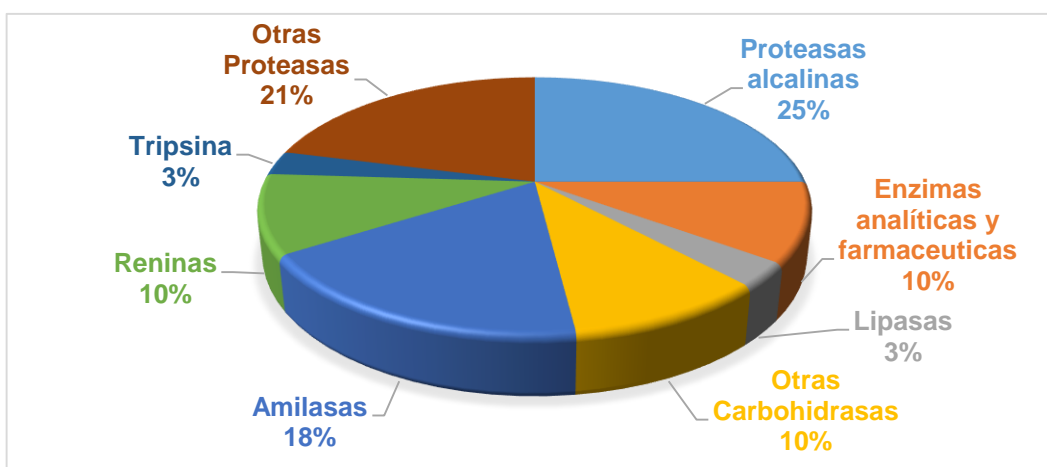
⁷ TEIJON, José. Bioquímica Estructural: Conceptos y Tests. 2 ed. Madrid. 2009. p 270-272.

1.2.1.6 Factores alostéricos. Hay algunas enzimas, que tienen un lugar activo y uno o más lugares de regulación, y son conocidas como las enzimas alostéricas. Una molécula que se une con los lugares de la regulación, se conoce como el factor de alostérico. Cuando esta molécula en el entorno celular, forma un enlace no covalente débil en el lugar de la regulación, la forma de la enzima y su centro de activación se modifican. Generalmente, este cambio disminuye la actividad de la enzima, a causa de la inhibición de la formación de un nuevo complejo enzima-sustrato. Sin embargo, hay algunos activadores alostéricos, que promueven la afinidad entre la enzima y el sustrato e influyen en el comportamiento enzimático positivamente.

1.3 EL MERCADO MUNDIAL DE LAS ENZIMAS

La industria de las enzimas tiene un valor a nivel mundial estimado en \$1 billón de dólares, del cual el 75% corresponde a enzimas hidrolíticas; las proteasas representan uno de los tres grupos de enzimas industriales y ocupan el 60% del mercado, como se puede observar en la gráfica 1⁸.

Gráfica 1. Tipos de enzimas y porcentajes de aplicación industrial⁹.



De acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular las proteasas están clasificadas en el subgrupo 4 del grupo 3 que son las hidrolasas. Sin embargo, debido a su gran diversidad de acción y a su estructura están subdivididas en dos grupos: Exopeptidasas y Endopeptidasas, dependiendo del sitio de acción. Las Exopeptidasas rompen el péptido cerca de los grupos terminales del sustrato, mientras que las

⁸ ZARAGOZA, Julián. Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. Trabajo de Maestría en Ciencias con orientación a Microbiología Industrial. Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. 2011. p 3.

⁹ *Ibíd.*, p 5.

Endopeptidasas lo hacen lejos de los grupos terminales¹⁰. A su vez, en base a sus grupos funcionales de acción son clasificadas en cuatro grupos; Serin-proteasas, Proteasas Aspárticas, Cistein-proteasas y Metallo-Proteasas:

- Serin-Proteasas: poseen en su centro activo un aminoácido de Serina esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas incluye a la tripsina, quimotripsina, subtilisina entre otras.
- Proteasas Aspárticas: se trata de enzimas bilobuladas donde el sitio activo está entre dos lóbulos homólogos. Cada lóbulo contribuye con un aspartato, el pH óptimo de actividad de la enzima es ácido para la mayoría de las aspártico proteasas, donde un protón está compartido por los dos aspartatos del sitio activo.
- Cistein-Proteasas: la familia de las cisteína proteasas engloba a todas aquellas proteasas que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico. Los miembros de esta familia que desempeñan un papel importante en los procesos apoptóticos en el sistema nervioso son las caspasas y las calpaínas.
- Metallo-Proteasas: tienen amplias diferencias en secuencias y estructura. La gran mayoría contienen Zn en sitio activo algunas Co.

1.4 DETERGENTES

Un detergente es un producto que posee propiedades de limpieza de superficies, es decir, son capaces de remover sustancias que son consideradas indeseables sobre distintos materiales, siendo generalmente superficies sólidas y/o compactas. Dicha propiedad es el resultado de la sinergia de diversas sustancias que combinadas, contribuyen y facilitan la remoción de sustancias de baja o nula solubilidad en el agua, por la interacción química entre las moléculas de suciedad y las detergentes¹¹.

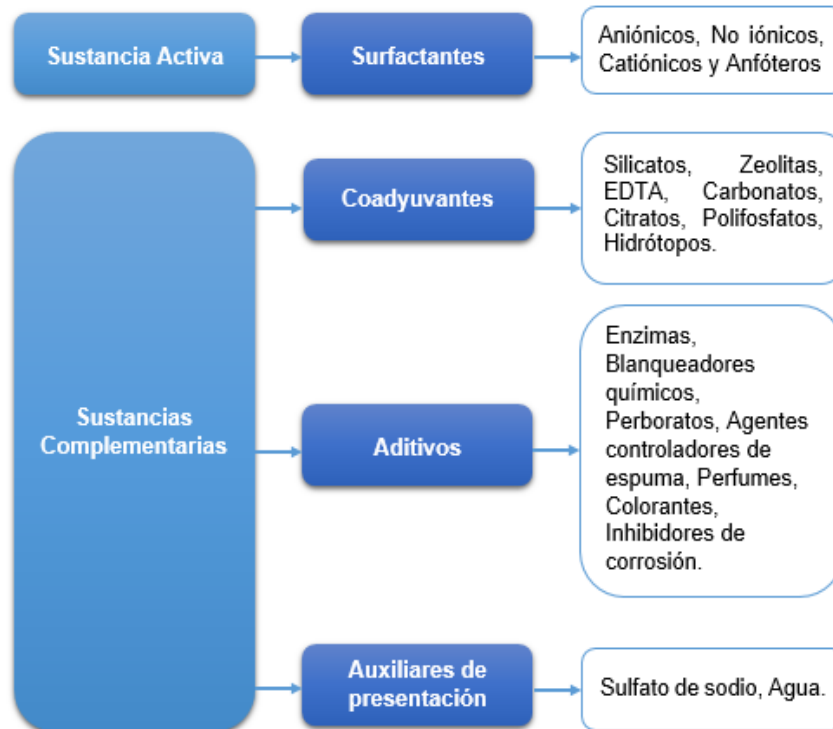
1.4.1 Composición de los detergentes. La composición de los detergentes varía dependiendo la finalidad que se le vaya a dar al producto o si está dirigido a tener una determinada función, dependiendo del sustrato o suciedad específica que se quiera remover e incluso, la presentación que este producto vaya a tener, ya sea un detergente en polvo o un detergente líquido. Aún con lo anterior, es posible establecer tipos de sustancias que hacen parte de la composición general de los

¹⁰ UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. Introducción al mundo de las proteasas. [en línea]. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2249/Introducci%C3%B3n_al_mundo_de_las_proteasas.pdf?sequence=5> p 4.

¹¹ SALAGER, Jean-Louis. Cuaderno FIRP S332-A. Detergentes: Componentes, fabricación, fórmulas. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 1.1988. p 14-15.

detergentes, la cual, para efectos del presente caso de estudio, se presenta en la figura 1, los grupos de sustancias que componen los detergentes líquidos.

Figura 1. Composición de un detergente líquido¹².



El aspecto más importante que se debe tener en cuenta y que debe primar a la hora de establecer una formulación detergente, es la composición de la matriz de sustancias activas, es decir, la elección del (los) surfactante(s), pues es esta la propiedad que cataloga o identifica a un producto químico, como un detergente. Dicha matriz, al estar conformada por una mezcla de surfactantes, requiere una revisión de las características de cada uno de los tipos de estas sustancias tensoactivas. A esta altura, es necesario realizar la aclaración sobre los términos “surfactantes” y “tensoactivos”, ya que la expresión “surfactante”, proviene del vocablo en inglés *Surfactant*, la cual, hace referencia a un agente activo de superficie, es decir, aquella sustancia que tiene la propiedad de modificar la tensión superficial en las superficies de contacto entre dos fases¹³. Como la palabra *Surfactant* no tiene traducción estricta al español, se usa el neologismo *Surfactante*, la cual tiene como equivalente en el idioma español la palabra

¹²ALMAJER, Deisi. Formulaciones Detergentes Biodegradables. Tesis Doctoral. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2004. p 22.

¹³ SALAGER Jean-Louis. Cuadernos FIRP S300-A Surfactantes: Tipos y Usos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 2. 2002. p 3.

Tensoactivo, razón por la cual y bajo el contexto del desarrollo de este proyecto se usan como palabras sinónimas.

La clasificación de los surfactantes se establece, de acuerdo a la forma en que estas sustancias se disocian en el agua, dependiendo de su estructura química. De acuerdo a esta estructura, estas sustancias pueden ser anfífilas, término que hace referencia a la dualidad polar de la sustancia, es decir, un extremo de la molécula es hidrófilico y el otro es hidrofóbico o lipofílico. Esto último, es un factor determinante para establecer la detergencia de un surfactante, dado que poder definir la relación entre qué tan hidrofílico y/o qué tan lipofílico es un surfactante, puede variar la funcionalidad de aplicación del tensoactivo. El parámetro que correlaciona estas variables, se conoce como *Balance Hidrófilo-Lipófilo (HLB)*, concepto que fue introducido por William Griffin en 1949, para la medición de la afinidad de los tensoactivos en las emulsiones de agua y aceite¹⁴. El HBL se mide, usando la relación de los pesos moleculares de la parte hidrofílica (H) e hidrofóbica (o lipofílica, L) mediante la expresión:

$$HLB = 20 \left(\frac{H}{H+L} \right) \quad (2)$$

El valor del HBL, sugiere las aplicaciones que los surfactantes pueden tener dentro de los productos, como lo relaciona la tabla 1.

Tabla 1. Relación de los valores de HBL de los surfactantes con su aplicación¹⁵.

Rango HBL	Aplicación
4 – 6	Emulsificante W/O
7 – 9	Agente Humectante
8 – 18	Emulsificante O/W
13 – 15	Detergente
15 – 18	Agente Solubilizante

1.4.1.1 Surfactantes aniónicos. Son aquellos que en solución acuosa se disocian en un anión anfífilo y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario¹⁶. Dentro de su estructura, se constituyen generalmente por el extremo polar, donde se encuentra el anión y una cadena alquílica que,

¹⁴ *Ibíd.*, p 116

¹⁵ GRIFFIN, William C. Classification of surface-active agent by “HLB”. *Journal Society Cosmetic Chemists*. Vol. 1. p 314.

¹⁶ SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP 302-PP Surfactantes Aniónicos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004. p 2.

dependiendo del número de carbonos, puede tener diversas finalidades, es decir, si la cadena está entre 9 a 12 carbonos, se usa como agente humectante, si está entre 12 y 13, se usa como agente detergente, si está entre 15 y 18 de carbono, tiene uso como agente emulsificante¹⁷.

1.4.1.2 Surfactantes catiónicos. Son sustancias que presenta la disociación de su molécula en un catión anfífilo y un anión de tipo halogenado, generalmente. Este tipo de surfactantes presentan usos en aplicaciones especiales donde la carga positiva del anfífilo, que comúnmente corresponde a un grupo de amonio cuaternario, produce ventajas como en enjuagues o emulsiones asfálticas¹⁸. Debido a este atributo del grupo de carga positiva, presenta propiedades bactericidas en productos de limpieza de distintos niveles de aplicación, pero presentan incompatibilidades con surfactantes de tipo aniónico y con algunos aditivos, como las enzimas, además de no ser considerados buenos agentes detergentes¹⁹.

1.4.1.3 Surfactantes no iónicos. Los surfactantes no iónicos son sustancias que al solubilizarse en el agua, no producen o aportan iones a la solución acuosa, fenómeno que permite la compatibilidad de estos, con cualquier tipo de sustancia. Dentro de sus características moleculares, se destaca que los surfactantes no iónicos de mayor uso a nivel industrial presentan diferentes grados de etoxilación en sus moléculas (grupos de óxido de etileno), situación que les permite ser considerados como buenos detergentes, humectantes y agentes emulsionantes. Algunos de este tipo no son tóxicos para el ser humano, motivo importante para ser usados en la industria cosmética y de alimentos²⁰.

1.4.1.4 Surfactantes anfóteros. Los surfactantes llamados anfóteros poseen dos grupos funcionales, uno aniónico, el otro catiónico. En la mayoría de casos es el pH quien determina el carácter dominante favoreciendo una u otra de las posibles disociaciones: aniónico a pH alcalino, catiónico a pH ácido. Cerca de su punto isoeléctrico ellos son realmente anfóteros, es decir poseen dos cargas a la vez y presentan a menudo un mínimo de actividad superficial. Estos surfactantes son en general muy poco irritantes, compatibles con los otros surfactantes y en la mayoría de los casos ellos pueden utilizarse en fórmulas farmacéuticas o cosméticas. Casi todos los anfóteros poseen un grupo catiónico de tipo amina o amonio, el cual puede estar eventualmente bloqueado por una cuaternización²¹.

¹⁷ *Ibíd.*, p 16.

¹⁸ SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP S301-PP Surfactantes: Generalidades, Materias Primas. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004, p 6.

¹⁹ SALAGER, Jean-Louis. Cuadernos FIRP S300-A Surfactantes: Tipos y Usos. *Op cit.*, p 36.

²⁰ *Ibíd.*, p 25.

²¹ *Ibíd.*, p 42.

1.4.2 Aplicación de proteasas como aditivos para detergentes. Las proteasas alcalinas microbianas dominan el mercado de las enzimas en la industria de los detergentes. Estas proteasas añadidas a los detergentes ayudan a la liberación de material proteico de las manchas. Además, permiten temperaturas de lavado menores y períodos cortos de agitación, después del periodo de enjuagado. Idealmente las proteasas y otras enzimas usadas en detergentes deben tener alta actividad y estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura. Estas enzimas, en teoría, deberían ser efectivas a bajos niveles de concentración en el detergente (0.04%-0.08%) y ser compatibles con la mayoría de los compuestos en los detergentes como los agentes oxidantes y secuestrantes iónicos. También deben tener una buena vida de anaquel; es decir que tengan actividad aún pasado un tiempo de almacenamiento prolongado²².

1.4.2.1 Estabilizadores de enzimas. La intención de incorporar enzimas proteolíticas en composiciones detergentes se debe, en esencia, a la eficacia que estas tienen para descomponer materiales de naturaleza proteica que se encuentran sobre textiles sucios. Adicionalmente, se sabe de las enzimas también, que presentan inestabilidad en composiciones acuosas, razón por la cual, además de requerir un exceso de enzimas en las formulaciones detergentes líquidas para compensar la pérdida esperada de la actividad enzimática durante períodos prolongados de almacenamiento, se debe garantizar que estas puedan permanecer activas y estables mediante la adición de sustancias que favorezcan estas condiciones, es decir, que permitan y contribuyan al correcto funcionamiento de este ingrediente activo, sin tener la certeza de cuánto tiempo pueda permanecer almacenado el producto enzimático. Dichas sustancias, que pueden ser: iones de calcio, formiato de sodio, ácido malónico o diácidos orgánicos, boratos, ácido cítrico, citrato de sodio, propilenglicol, polioles, entre otras; permiten estas condiciones favorables para la enzima, se puedan dar, sin tener que modificar drásticamente las composiciones de los componentes restantes y aun así, permitiendo una mejora en su desempeño²³.

²² ZARAGOZA Julián. Aislamiento de cepas de Bacillus productoras de proteasas con potencial uso industrial. Trabajo de Maestría en Ciencias con orientación a Microbiología Industrial. Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. 2011. p 20.

²³ COMPOSICIÓN ESTABILIZANTE DE ENZIMAS Y SU UTILIZACIÓN EN COMPOSICIONES DETERGENTES MEJORADAS QUE CONTIENEN ENZIMAS ESTABILIZADAS. Inventor HOAI – CHAU CAO. Fecha de solicitud: 16, octubre, 1991. New York, patente de investigación 0451924, 1, Julio, 1999.

1.5 PROPIEDADES DE LOS DETERGENTES²⁴

Los detergentes se caracterizan principalmente por:

- **Tensoactividad:** Es la disminución de la tensión superficial del agua que permite mayor penetración del agente de limpieza dentro de la suciedad, y así mismo abarcar una mayor superficie.
- **Humectación:** Se entiende como la capacidad de mojar más, es decir una misma gota de agua es capaz de abarcar una mayor superficie de contacto.
- **Penetración:** Como la palabra lo indica, es la capacidad de penetrar o introducirse en las superficies porosas sucias o en la suciedad.
- **Emulsión:** Es la dispersión o suspensión de finas partículas de uno o más líquidos en otro líquido. Por ejemplo, el aceite o grasa en agua.
- **Suspensión:** Consiste en dejar la suciedad o partículas de suciedad en solución, evitando que estas se vuelvan a re-depositar. Mientras la tensión superficial permite una mayor penetración de agua sobre la superficie, el detergente rompe la suciedad en pequeñas partículas (dispersión) luego la mantiene en suspensión lo que provoca que pueda ser removida fácilmente.

1.5.1 Detergencia. Se conoce bajo el termino detergencia el proceso de eliminación de las sustancias indeseadas adheridas a objetos o a la piel de los seres vivos. El efecto de limpieza que se logra mediante la aplicación de un detergente no se debe tan solo a la acción del tensoactivo, sino a la adecuada combinación de distintos efectos que actúan sinérgicamente sobre el sustrato sucio²⁵.

1.5.1.1 Proceso de detergencia²⁶. La detergencia consiste en la extracción del sucio en un sustrato, mediante un compuesto que tiene la capacidad de emulsificar, humectar, flocular, blanquear e inhibir la corrosión inherente en el proceso de lavado; asegurando que los materiales pertenecientes a los tejidos, por

²⁴ CASALLAS, Nicolás, IBAÑEZ, Kelly. Diseño de un sistema a nivel piloto para la remoción de detergentes aniónicos de una solución preparada con características de una lavandería tipo con el fin de reducir la concentración letal media (cl50-48) para daphnia pulex. Trabajo de grado Ingeniero ambiental y sanitario. Bogotá. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. 2008. p 29.

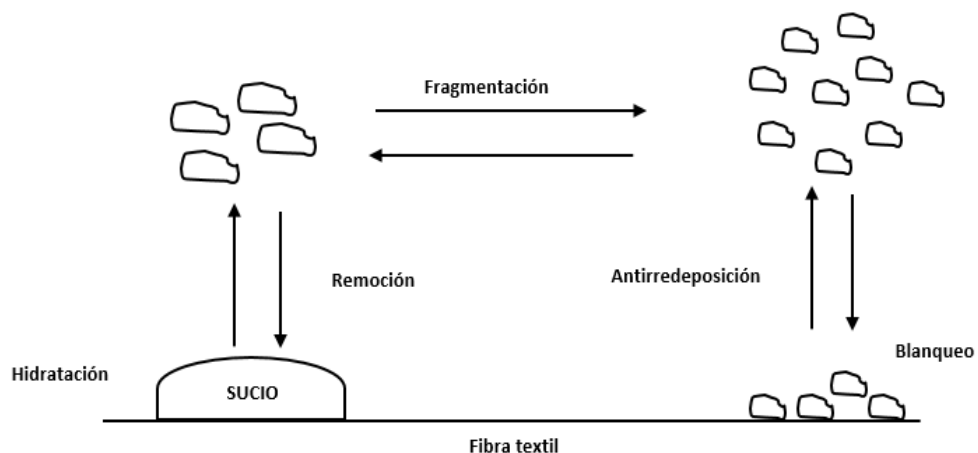
²⁵ SILVA, Madeleine. Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido. Trabajo de grado Bioquímico Farmacéutico. Loja, Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica. 2015. p 7.

²⁶ ZAMBRANO, Joel. Ingeniería básica de una planta comercial de detergente líquido. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Sartenejas, Venezuela. Universidad Simón Bolívar. Coordinación de Ingeniería Química. 2010. p 6.

ejemplo, los colorantes, no sean afectados. El mecanismo físico-químico que está involucrado en el proceso es altamente complejo. Sin embargo, puede ser descrito en seis pasos (Figura 2).

1. Es necesario hidratar las piezas de tela, debido a que sufren un proceso de almacenamiento previo al lavado, durante el cual el sucio pierde gran parte de su humedad.
2. Remoción del sucio de la tela por medio de acciones mecánicas y químicas.
3. Fragmentación del sucio en partículas pequeñas, dispersiones o componentes solubles en agua, por medio de diversos componentes presentes en la formulación del detergente.
4. Prevención de re-deposición de los fragmentos de sucio o trazas de manchas sobre la tela ya lavada.
5. Blanqueo del sucio residual o re-depositado (percutido) con la finalidad de dar una mejor sensación y resultado visual.
6. Modificación final de la fibra para mejorar la satisfacción del consumidor, utilizando para ello agentes tales como abrillantadores, perfumes, polímero anti-re depositantes de sucio y agentes acondicionadores de tejido.

Figura 2. Mecanismo general de la detergencia²⁷.



²⁷ *Ibíd.*, p 7.

1.5.1.2 Variables que afectan la detergencia. Las principales variables que afectan la detergencia son: la naturaleza y características del sustrato, la suciedad, el baño de lavado (concentración y estructura del tensoactivo, dureza del agua, coadyuvantes, enzimas, etc.), la temperatura, el tiempo de duración del lavado y las condiciones hidrodinámicas (agitación, caudal). Asimismo, otros factores que también influyen en la eficacia del proceso detergente son la presencia de electrólitos, el pH del baño, la capacidad espumante del detergente y el método de lavado utilizado²⁸.

1.5.2 Factores que influyen en la acción de los detergentes²⁹

- **Temperatura:** la suciedad, al igual que casi todas las sustancias, se disuelven más rápidamente en agua a altas temperaturas que en agua fría; los constituyentes insolubles de la suciedad, son más fácilmente suspendidos o emulsificados a altas temperaturas. Muchas grasas y aceites son sólidos o semi-sólidos a temperatura ordinaria y líquidas a altas temperaturas, por tanto, es más fácil formar las emulsiones. Los detergentes que tienen cadena de 12 carbonos trabajan mejor a bajas temperaturas y los de cadenas largas, lo hacen mejor a altas temperaturas. La mayoría de los detergentes trabajan mejor en un rango de temperatura comprendido entre los 37 y 60°C.
- **El pH:** la acción limpiadora de los detergentes es afectada por la acidez o alcalinidad de las soluciones. Los detergentes pueden ser usados en soluciones con pH menor que 7, pero la mayoría presentan mejores resultados en los lavados cuando en condiciones básicas, es decir, en el rango alcalino, siendo el óptimo en las cercanías de pH 10,5. Como los detergentes sintéticos generalmente son neutros, se debe añadir al baño de lavado sustancias alcalinas, siendo las más usadas los carbonatos que poseen cierto poder detergente.

1.6 METODOLOGÍA DE DISEÑO DE PRODUCTOS QUÍMICOS³⁰

El diseño de productos químicos merece mayor énfasis debido a grandes cambios que han ocurrido en la industria química. No sostiene que deba desaparecer la preocupación del ingeniero químico con el proceso de diseño, pero tampoco sostiene que la mayor parte del plan de estudios principal de cursos de ingeniería química sea redundante. Al contrario, se cree que las habilidades de los ingenieros químicos son muy versátiles y se pueden aplicar a los problemas de diseñar productos químicos eficazmente como lo han hecho por tanto tiempo

²⁸ ALMAJER, Deisi. Formulaciones Detergentes Biodegradables. Tesis Doctoral. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2004, p 36.

²⁹ *Ibíd.*, p 35.

³⁰ MOGGRIDGE, G. CUSSLER, E. Chemical Product Design. *Cambridge Series in Chemical Engineering*. UK. University Press. 2001.

aplicado a procesos químicos. Esta metodología pretende dar a entender, que el diseño de un producto puede resultar en una opción más viable al momento de satisfacer necesidades del mercado o la industria, que la optimización o transformación de los procesos de producción actuales. El procedimiento de diseño de productos químicos es un esquema de diseño de pasos sencillos, centrada en torno a los conceptos de “necesidades”, “ideas”, “selección” y “fabricación”. Esquemas similares se dicen que se han utilizado en empresas como DuPont, Motorola, etc. Los cuatro pasos son:

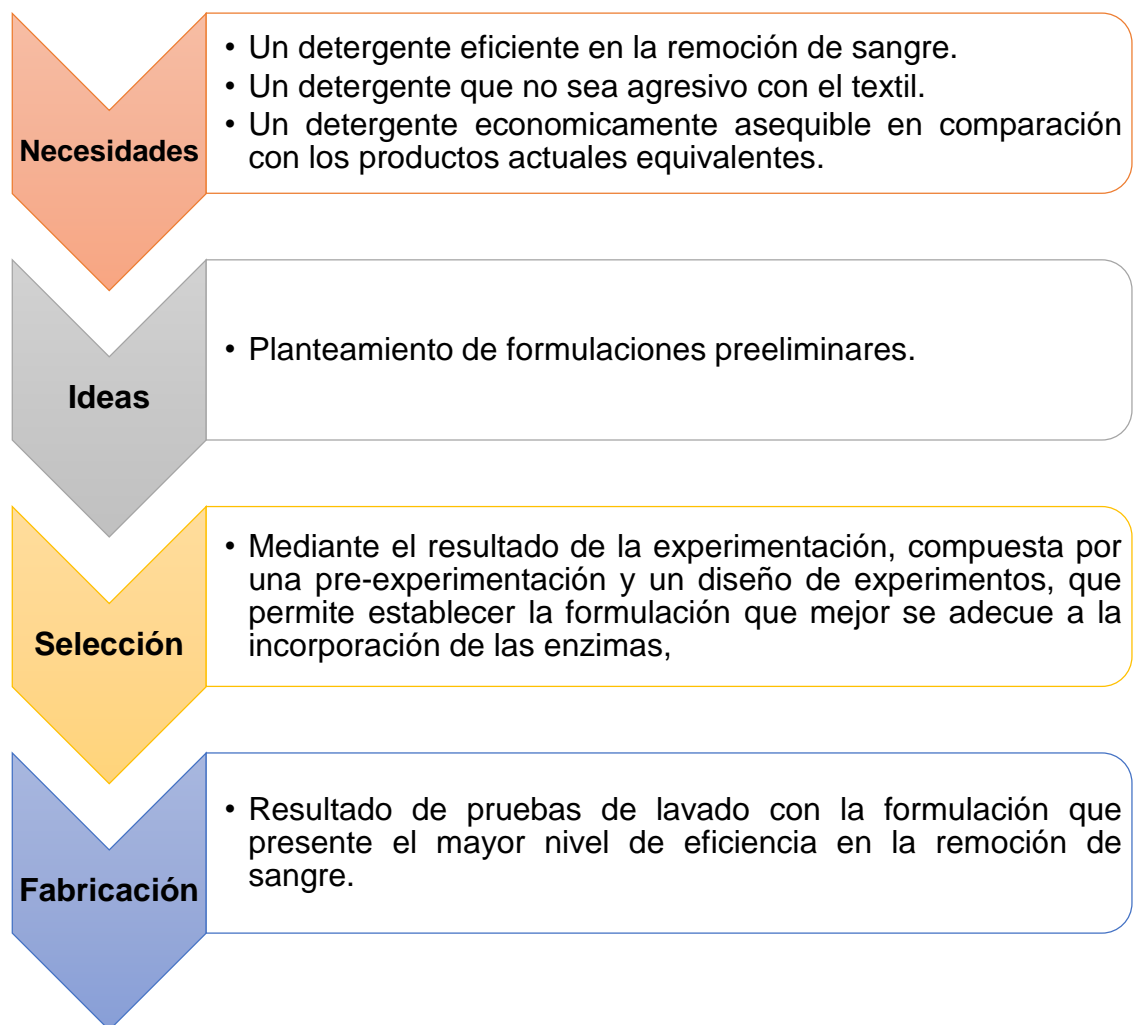
- I. Necesidades.** ¿Qué necesidades debería el producto llenar?
- II. Ideas.** ¿Qué productos diferentes podrían llenar esta necesidad?
- III. Selección.** ¿Qué ideas son las más prometedoras?
- IV. Fabricación.** ¿Cómo podemos hacer el producto y probarlo críticamente?

El primero es la identificación de necesidades del cliente y la traducción de las necesidades en especificaciones del producto, El segundo paso implica generar y aventar ideas para llenar estas necesidades, en el tercer paso las mejores ideas se eligen para el desarrollo comercial, y el último paso requiere la creación de prototipos de productos, las decisiones sobre la ruta de fabricación y la estimación de las fronteras económicas.

2. METODOLOGÍA

Para la fabricación del detergente, se siguió el protocolo establecido en la guía metodológica para el diseño de productos químicos, propuesta por los ingenieros químicos G.D. Moggridge y E.L. Cussler, mencionada anteriormente. Dicho proceder plantea cuatro (4) pasos esenciales para el diseño, los cuales tienen como inicio el establecimiento de las necesidades que el producto en cuestión pretende satisfacer y finaliza con la presentación de la propuesta donde se establecen todos los requerimientos para la fabricación del producto. La metodología mencionada se resume en la Figura 3.

Figura 3. Aplicación de la metodología de diseño de productos químicos.



2.1 EQUIPOS

Para la producción del detergente, además de las materias primas, se deben tener a disposición equipos que permitan la producción del detergente y la evaluación de las características del mismo. Por lo anterior, se presentan generalidades de cada equipo utilizado durante la fabricación del detergente.

- **Agitador RW 20 digital IKA:** el agitador tiene como función mezclar las materias primas seleccionadas en el agua. Este equipo en sí, puede ser utilizado para agitar y mezclar líquidos de alta y baja viscosidad.
- **Balanza Analítica PIONNER –OHAUS:** permiten la medición de la masa de sólidos y líquidos, es decir, permiten pesar las muestras que serán utilizadas en las diversas pruebas del laboratorio químico. Para pesar un material sin tomar en cuenta el peso del recipiente que lo contiene, se debe tarar.
- **Viscosímetro BYK DB-E:** es un equipo para la determinación de la viscosidad absoluta por el principio rotacional, consiste en la rotación de un husillo sumergido en la muestra y una velocidad constante. La resistencia generada por el producto sobre el husillo es directamente proporcional a la viscosidad.
- **pH-metro multiparámetro TRACER de LAMOTTE:** su uso en el laboratorio es principalmente medir una característica de las sustancias que presenta gran interés para estimar el carácter ácido o básico de una sustancia: el pH.

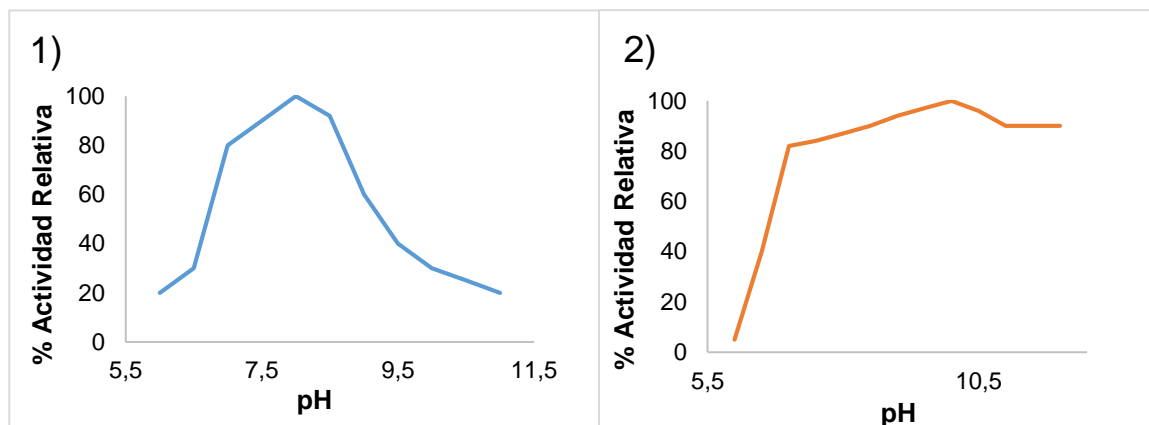
2.2 MATERIAS PRIMAS

Para el planteamiento de las formulaciones, se realizó un estudio preliminar de los componentes básicos que tiene un detergente líquido, los cuales se mencionaron anteriormente.

En el presente caso de estudio, se parte de la sustancia activa a evaluar en la formulación del detergente líquido, la cual es la enzima, específicamente proteasas de tipo *Serina*, conocidas también como *Serin-Proteasas*. Estas enzimas de origen bacteriano, tienen la característica de hidrolizar o degradar proteínas y aminoácidos insolubles adheridos a las fibras textiles, facilitando su remoción de dichas fibras, sin afectar su calidad o resistencia de las mismas. Dicho esto, serán objeto de evaluación en las formulaciones detergentes, las enzimas proteasas *Purafect® Prime L* y *Effectenz™ P100*, donde uno de los parámetros importantes a tener en cuenta para el buen rendimiento de las enzimas es el pH, siendo un pH 8 el valor donde la enzima *Purafect® Prime L* presenta mejores rendimientos y un pH de 10 para la enzima *Effectenz™ P100* (Figura 4). Es claro que, al momento de incorporar las enzimas en las formulaciones, estas se deben ajustar a los valores establecidos anteriormente,

por lo cual, es necesario agregar sustancias que permitan este ajuste, donde se usó hidróxido de sodio (NaOH) o ácido cítrico (C₆H₈O₇).

Figura 4. Actividad enzimática de las enzimas *Purafect® Prime L* (1) y *Effectenz™ P100* (2) en función del pH³¹.



Identificadas las características de las enzimas proteasas a utilizar, se establecen los componentes restantes de una formulación de detergente líquido y de acuerdo con el interés de este proyecto, se busca la preparación de una formulación elemental, es decir, usar componentes estrictamente necesarios para la producción de un detergente funcional, dejando a un lado aquellos componentes que mejoren el aspecto físico y de presentación o que brinden otros atributos que no estén directamente relacionados con la función del detergente.

En consecuencia, se tomó como base del detergente el agua, debido a sus propiedades como solvente universal y bajo costo. Para la elección de la matriz de surfactantes, se tuvo en cuenta la funcionalidad de estos como sustancias activas a potenciar y se consideraron los surfactantes de tipo aniónicos y no iónicos, descartando los catiónicos y los anfóteros. Lo anterior se debe a la compatibilidad que estos tienen con la enzima, puesto que las sustancias con grupos iónicos cargados positivamente (catiónicos y anfóteros) afectan la estabilidad de las proteasas, afectando la cobertura de polisacáridos que la protege (información privilegiada del proveedor), además los surfactantes catiónicos no presentan buenos atributos como detergentes de textiles, situación similar de los surfactantes anfóteros. Por ende, se decide usar una mezcla de surfactantes aniónicos y no iónicos de cadenas carbonadas lineales cortas (entre 10 y 13 C), donde el surfactante debido al buen desempeño que estos tienen en cuanto a detergencia se refiere, además de ser afines para las enzimas y teniendo en cuenta además el substrato a remover (materia orgánica, sangre).

³¹ Ficha Técnica *Purafect® Prime L* (1) y *Effectenz™ P100* (2), Merquiand S.A.

Conocidos los tipos de surfactantes a usar en la formulación detergente, se realizó la selección de los surfactantes, de acuerdo con la disponibilidad comercial y el uso previo en la empresa Saint Germain Ltda., la cual codifica los nombres de sus materias primas para efectos de reserva empresarial. En la tabla 2, se resumen los tensoactivos escogidos para la formulación.

Tabla 2. Surfactantes seleccionados para conformar la matriz de sustancias activas.

Surfactantes Aniónicos	HLB / Cadena Carbonada	Surfactantes No Iónicos (Etoxilación)	HLB / Cadena Carbonada
SA 10	N.D. / 10-14	SX 05 (10 Moles)	10,1 / 9
SA 20	N.D. / 12	SX 06 (No Etoxilado)	N.D. / 9
		SX 07 (No Etoxilado)	9,7 / N.D.
SA 30	N.D. / 10	SX 08 (30 Moles)	17,1 / 9
		SX 09 (35 Moles)	17,6 / 8

* N.D. No Determinado

Para completar la formulación, es necesario garantizar la estabilidad de la mezcla de surfactantes, adicionando una sustancia que garantice la formación de la emulsión, teniendo como fase dispersa la mezcla surfactante. Para este efecto, se escogió como sustancia estabilizante, conocida también como hidrótopo, al Dietilenglicol ($C_4H_{10}O_3$), la cual cumple la función de facilitar la disolución de los surfactantes en la formulación³², además de contribuir a la estabilización de la enzima proteasa que se incorpora al detergente. Adicionalmente, para el correcto funcionamiento de la enzima, se requiere la activación de la región activa de la misma con la presencia de un cofactor en la formulación, por tal razón, se opta por la adición de cloruro de calcio ($CaCl_2$), sustancia capaz de aportar iones de calcio necesarios para la activación de la enzima, y que además de mejorar la actividad catalítica de la enzima, proporciona estabilidad térmica; y son indispensables para la estructura funcional y estable de la proteasa³³. Como es lógico, a la formulación no se agregan agentes secuestrantes de iones a la formulación, puesto que iría en contra de la finalidad de activar y mantener la enzima estable en la formulación detergente. En el cuadro 2, se resumen las materias primas a utilizar.

³² SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP 302-PP Surfactantes Aniónicos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004. p 14-15.

³³ PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS, LIQUIDOS, ESTABILIZADOS. Inventor HENKEL Y CIE GMBH. Alemania, patente de Invención 4003, 2, Octubre, 1973.

Cuadro 2. Componentes usados en la preparación de las formulaciones.

Componente	Materia Prima
Auxiliar de Presentación (Base del Detergente)	Agua
	SA 10
Surfactantes Aniónicos	SA 20
	SA 30
	SX 05
	SX 06
Surfactantes No Iónicos	SX 07
	SX 08
	SX 09
Hidrótopo	Dietilenglicol
Enzimas	Proteasas pH 8
	Proteasas pH 10
Sustancia aportante de Iones cofactores	Cloruro de Calcio
Acondicionadores de pH	Hidróxido de Sodio
	Ácido Cítrico

2.3 PREPARACIÓN DE FORMULACIONES

Conocidos los componentes de la formulación del detergente, es necesario establecer parámetros de composición iniciales, que permitan conocer el comportamiento que tienen estas sustancias cuando se someten a mezclado, además de la incidencia de las variables del proceso de producción y así poder evaluar las diferentes formulaciones y poder obtener datos precisos, para llevar a cabo el diseño experimental para determinar qué formulación es la más eficiente y que pueda cumplir con los objetivos trazados en el diseño del producto.

Para llevar a cabo la preparación de las formulaciones, se configura un sistema de mezclado con agitación, usando un Beaker de vidrio de 400 ml de capacidad, 7 cm de altura y 7,7 cm de diámetro, donde la agitación se lleva a cabo mediante el uso de un agitador IKA RW20 con propela de superflujo. La adición de las materias primas se hizo componente por componente, a través de las paredes del Beaker, con una velocidad de agitación de 500 RPM, midiendo el tiempo en que cada componente se mezcla homogéneamente. Es importante resaltar que las enzimas deben ser estabilizadas antes de ser adicionadas a la mezcla detergente, motivo por el cual, éstas se agregaron en último lugar, disueltas en una solución compuesta por una parte de la cantidad total del hidrótopo que compone la formulación y cloruro de calcio. Cabe aclarar que, antes de agregar la solución estabilizada de enzima, se debe realizar el control del pH resultante de las preparaciones detergentes, el cual se llevó a cabo mediante el uso del medidor multiparámetro TRACER de LAMOTTE, para posteriormente ser ajustados a los niveles requeridos con las sustancias acondicionadoras de pH. Con el pH de las formulaciones ajustadas a los requerimientos de la enzima, se adicionó en última instancia la solución enzimática, de la misma manera en la que se agregaron los demás componentes de la formulación. Es de resaltar que la preparación de cada formulación se realizó por duplicado, es decir, se preparó una formulación principal y una réplica.

2.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Con el fin de evaluar el desempeño de las formulaciones preparadas, se debe contar con muestras que se asemejen al objetivo final del detergente enzimático: remover sangre de las fibras textiles de algodón – poliéster. Para tal efecto, se logra la obtención de sangre humana, mediante la extracción intravenosa del fluido vital, a un donante de esta investigación, procedimiento que se llevó a cabo por una profesional en el área de enfermería, teniendo en cuenta todos los protocolos para su extracción, almacenamiento y correcta disposición de residuos. Para la preparación de las muestras, se empleó una sábana de uso clínico nueva, cuya composición es de 90% algodón y 10% poliéster (de acuerdo a la información provista en la etiqueta) y que no tuvo ningún tratamiento previo a la preparación de las muestras, de la cual se cortan cuadros de 15x15 cm, doblando cada cuadro en 4 partes, a manera de cuadrantes, tomando el peso de cada una de estas,

antes de adicionar la sangre. Con estos datos establecidos, se agregó posteriormente, 1 ml de sangre en cada cuadrante de cada muestra, la cual se esparció de manera aleatoria y se dispuso a secado al ambiente durante 24 horas. Finalmente, se tomó el peso de cada una de las muestras cuando estuvieron secas.

2.5 PRUEBAS DE LAVADO

Las pruebas de lavado son en definitiva, el parámetro más importante para la evaluación de cada formulación. Por esta razón, se evalúa cada formulación con el lavado de las muestras previamente preparadas, simulando las condiciones de lavado usando un Beaker plástico de 1000 ml de capacidad, 14 cm de alto y 10 cm de diámetro, en donde se adicionan 500 ml de agua, la cual se encontró a una temperatura promedio de 14 °C y donde se disuelven 5 ml de la formulación detergente a evaluar. A esta solución de agua y detergente, se sumerge la muestra con sangre, donde se lleva a cabo el lavado del textil, usando el agitador IKA RW20 con propela de superflujo a 300 RPM por 10 minutos, posteriormente, se cambia el agua y se enjuaga la muestra usando las mismas revoluciones y tiempo. Una vez lavada la muestra, se somete a secado a temperatura ambiente durante 24 horas. Es importante aclarar que para la evaluación de las formulaciones pre-experimentales se tuvo contemplado una muestra principal y dos (2) réplicas para la corroboración de los datos, garantizando las mismas condiciones en la prueba de lavado para todas y cada una de las muestras.

2.6 PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Una de las medidas de control que se debe ejercer sobre el detergente, es determinar si las formulaciones que fueron preparadas, presentan estabilidad en sus emulsiones, por lo que es necesario realizar un adecuado seguimiento a estas preparaciones. Para tal efecto, se disponen 10 ml de cada preparación en tubos de ensayo, los cuales se dejan en reposo a través del tiempo, realizando una verificación en determinados momentos: el primero, a la hora de haberse preparado las formulaciones; el segundo, a las 24 horas, el tercero a las 48 horas, el cuarto a los 30 días y el quinto control a los 60 días. Dicha prueba se realizó a condiciones de temperatura ambiente y donde pretende corroborar a través de estos controles que las formulaciones preparadas pueden conservar las propiedades visuales, es decir, estabilidad de fase, color y viscosidad en lapsos de tiempo que logran simular tiempos y condiciones de almacenamiento de un producto a baja exposición de luz.

2.7 DETERMINACIÓN DE PERFILES DE VISCOSIDAD

Para definir los perfiles de viscosidad de las formulaciones preparadas, se usa un viscosímetro digital BROOKFIELD DB-E con eje #03, donde el detergente se envasa en un Beaker de vidrio de 400 ml de capacidad, 7 cm de altura y 7,7 cm

de diámetro, donde el eje del viscosímetro se sumerge hasta el tope que el equipo permite. Este equipo mide la viscosidad de la sustancia en análisis, mediante la variación de la velocidad de deformación, medida en revoluciones por minuto (RPM). Para el caso de estudio se evaluarán velocidades de deformación de 5, 6, 10, 12, 20, 30, 50, 60, 100 RPM. Dicho análisis se realizó una sola vez, por cada formulación, a una temperatura promedio de 14 °C.

2.8 FOTOMICROGRAFIA

Se tomó una muestra del detergente enzimático, la cual se colocó en un portaobjetos de 75 mm x 25 mm, para ser analizada en un microscopio con cámara adaptada, con un lente objetivo de 40x y así obtener la primera fotografía de la muestra. Para la segunda muestra se tomó el portaobjetos de 75 mm x 25 mm, donde además se usó un cubreobjetos de 20 mm x 40 mm para cubrir la muestra. Acto seguido y con un lente objetivo de 100x, mediante la técnica conocida como "*objetivo de inmersión*", se tomó una gota de aceite de inmersión y se depositó sobre la muestra para facilitar la observación de esta y así poder aumentar la cantidad de la luz que atraviesa a la muestra, logrando una captura de mejor calidad.

2.9 PRUEBA COMPARATIVA POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

La espectrofotometría es un método de análisis que se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. El análisis por espectrofotometría UV-Vis, se realiza con un espectrofotómetro GENESIS 10S; el cual busca cuantificar la concentración de sangre resultante en las muestras de tela, luego de realizadas las pruebas de lavado. El procedimiento se realiza, según la técnica del reactivo de Kastle Meyer³⁴, la cual consiste en tomar una micro pipeta para depositar en una cubeta 0,5 ml de agua oxigenada al (3%) y 2,0 ml de fenolftaleína al (1%) en alcohol etílico, con el fin de detectar sangre en una muestra de tela de 1x1 cm. Posteriormente se mide la absorbancia del "blanco" de calibración, el cual es el punto de referencia y al que se le asigna el valor de cero. Seguidamente, se realiza la lectura a las soluciones preparadas en las celdas con las dos muestras a comparar, es decir, el análisis se realizó a una única muestra lavada con la solución detergente resultante del desarrollo experimental y otra única muestra lavada con un detergente de comparación disponible en el mercado, a una longitud de onda de 480 nm evaluando.

³⁴ Universidad de Valencia. Introducción. [en línea]. <<http://www.uv.es/acastell/1.-Introduccion.pdf>> p 15.

3. EXPERIMENTACIÓN

El desarrollo experimental que se siguió en este trabajo de investigación, parte del planteamiento de un primer grupo de formulaciones, cuya intención es determinar cuáles son los surfactantes que mejor se adecuan al funcionamiento de las enzimas, mediante pre-experimentación, donde posteriormente, con la información recopilada de esta, plantear el diseño de experimentos, donde se logra obtener un grupo de formulaciones a evaluar e identificar cuál de ellas es la más eficiente y se ajusta a los objetivos para los cuales se está diseñando el producto.

3.1 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS

Esta primera parte del desarrollo de la experimentación, pretendió identificar y determinar cuáles son los componentes que deben hacer parte de la formulación del detergente líquido enzimático, realizando las preparaciones de formulaciones, donde se varían algunos de sus componentes principales.

3.1.1 Selección del surfactante aniónico. El planteamiento del primer grupo de formulaciones surge de una composición de un detergente líquido sugerida por la experiencia del departamento de investigación de la empresa Saint Germain (tabla 3) y cuyo objetivo fue evaluar el comportamiento de las 3 opciones de surfactantes aniónicos disponibles y el comportamiento de los 2 tipos de enzima disponibles (tabla 4).

Tabla 3. Formulación detergente para el desarrollo de la primera parte de la experimentación.

Componente	Composición (%)
Agua (Fijo)	55
Hidrótopo (Fijo)	8
Surfactante Aniónico 1 (A variar)	9
Surfactante Aniónico 2 (A variar)	13
Surfactante No Iónico (Fijo)	14
Enzima (A variar)	1
Cofactor (Fijo)	0,02

Tabla 4. Primer grupo de formulaciones, variando los surfactantes aniónicos y las enzimas.

Componente	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Agua	110 g	110 g	110 g	110 g	110 g	110 g
Hidrótopo	17,47 g	17,47 g	17,47 g	17,47 g	17,47 g	17,47 g
SA 10	18,15 g	-	18,15 g	18,15 g	-	18,15 g
SA 20	24,96 g	24,96 g	-	24,96 g	24,96 g	-
SA 30	-	18,15 g	24,96 g	-	18,15 g	24,96 g
SX 05	27,20 g	27,20 g	27,20 g	27,20 g	27,20 g	27,20 g
CaCl₂	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g
Proteasas pH 8	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	-	-	-
Proteasas pH 10	-	-	-	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Con la preparación del primer grupo de formulaciones, se llevó a cabo la medición de los tiempos de agitación en los que cada componente logró solubilizarse en la mezcla y que están resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Tiempos de agitación intermedios de los componentes en la formulación.

Componente	Tiempo de Agitación
Agua	-
Hidrótopo	10 min
SA 10	25 min
SA 20	15 min
SA 30	30 min
SX 05	15 min
CaCl₂	10 min
Proteasa pH 8	10 min
Proteasa pH 10	10 min

Como se mencionó en el capítulo anterior, la adición de las enzimas requería del acondicionamiento del nivel de pH, motivo por el cual, antes de la adición de la solución estabilizada en enzimas a la mezcla detergente, se realizó la medida del pH resultante de la solución detergente preparada, el cual fue ajustado, de acuerdo a los requerimientos de las enzimas a utilizar en cada formulación. En la tabla 6, se muestran los valores de pH iniciales de cada formulación y que después de ser ajustados.

Tabla 6. pH inicial y final del primer grupo de formulaciones preparadas.

Formulación	pH Inicial	pH Final
1	2	8
2	7	8
3	2	8
4	2	10
5	7	10
6	2	10

3.1.2 Pruebas de lavado primer grupo de formulaciones. Las pruebas de lavado, se realizaron siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior. Esta prueba de desempeño buscó determinar cuál de las formulaciones del primer grupo resulta más eficiente en la remoción de la mancha de sangre. Para tal efecto, el resultado de estas pruebas tuvo 2 análisis: el primero cuantitativo mediante gravimetría, el cual busca determinar numéricamente la remoción de la sangre y un método cualitativo, mediante pruebas de percepción y observación a contraluz.

Para el primer análisis, se tomaron los pesos de las muestras antes y después de la impregnación de la sangre sobre los textiles, tomando también el peso de las muestras después de realizar el lavado y secado de las mismas. Con estos valores, que se encuentran relacionados en la tabla 7, se calcula el porcentaje de remoción de cada producto evaluado, mediante la aplicación de la ecuación (2)³⁵.

$$\% \text{ de Remoción} = \left(\frac{(\text{Peso con sangre}) - (\text{Peso lavado})}{(\text{Peso con sangre} - \text{Peso Inicial})} \right) * 100 \quad (2)$$

³⁵ MUNAR, Jessica. Producción de un desengrasante enzimático de uso industrial en Produquim Ltda. Trabajo para optar por el título de Ingeniera Química. Bogotá. Universidad de América. Facultad de Ingeniería. 2013. p 53.

Tabla 7. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para el primer grupo de formulaciones.

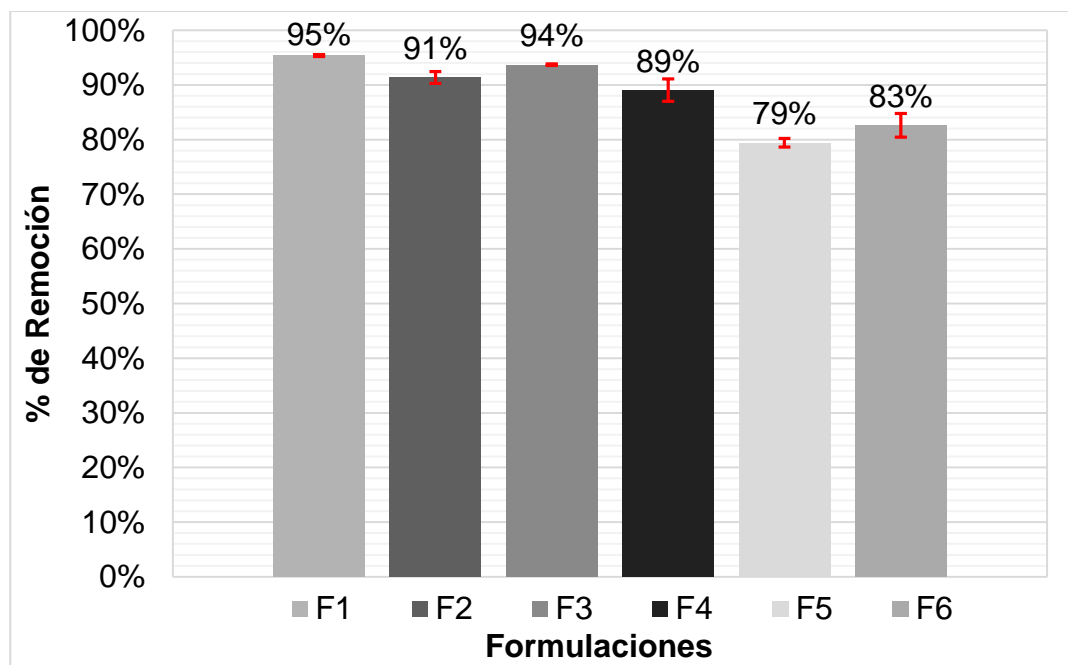
Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
1	2,57	3,22	2,60
2	2,58	3,16	2,63
3	2,58	3,69	2,65
4	2,59	3,32	2,67
5	2,56	3,24	2,70
6	2,56	3,25	2,68

Llevando a cabo la aplicación de la ecuación (2) con los datos consignados en la tabla 7, se obtienen los resultados cuantitativos de la remoción de sangre efectuada por el primer grupo de formulaciones (tabla 8).

Tabla 8. Resultados del cálculo de los porcentajes de remoción para el primer grupo de formulaciones.

Muestra	Formulación Utilizada	Porcentaje de Remoción
1	F1	95%
2	F2	91%
3	F3	94%
4	F4	89%
5	F5	79%
6	F6	83%

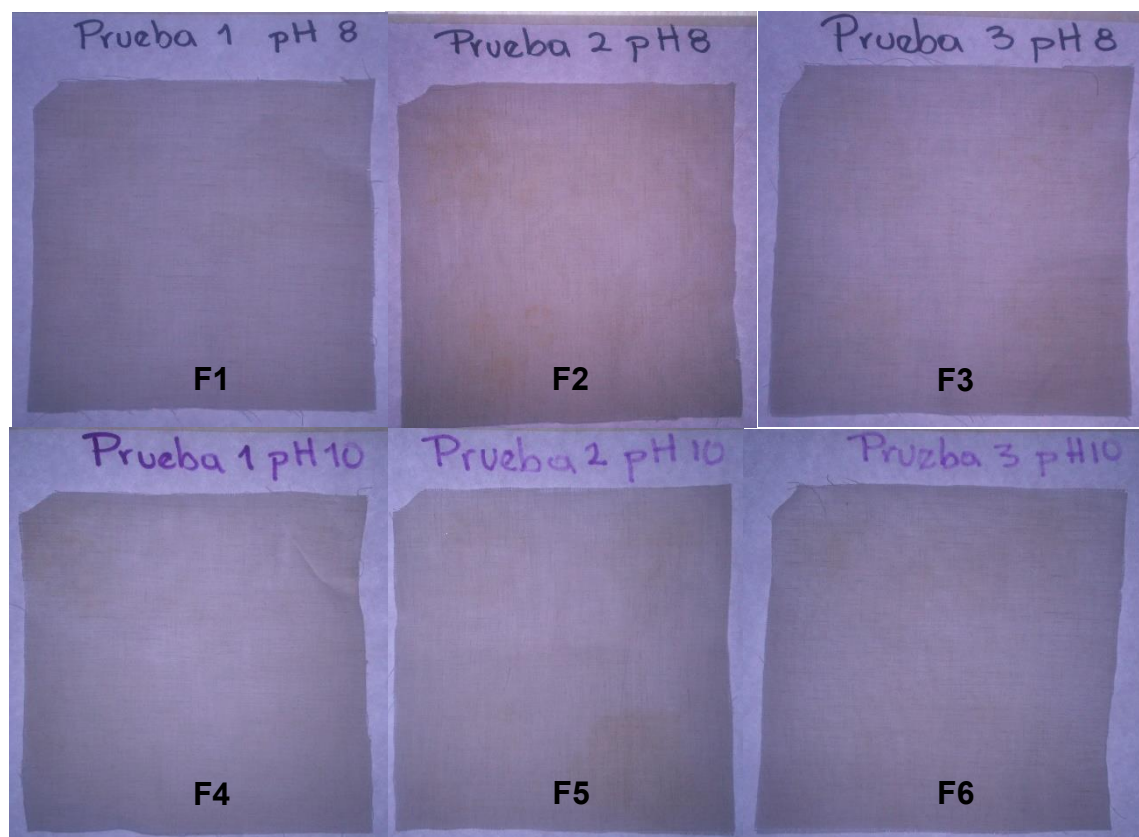
Gráfica 2. Porcentaje de remoción del primer grupo de formulaciones. Las barras de error representan la desviación del valor de la media, basado en los duplicados de las muestras totales.



Como se evidencia en los resultados gráficos de la remoción de sangre, presentados en la gráfica 2, se obtienen buenos resultados en todas las formulaciones preparadas, en términos generales, pero realizando un análisis más profundo en cuanto a la composición de las formulaciones, se observa que las formulaciones F1, F2 y F3 presentan rendimientos por encima del 90%, situación que es de remarcar, porque a estas preparaciones se le adicionó el mismo tipo de enzima, cuyos niveles de pH se ajustaron a un valor de 8 *Purafect® Prime L*, característica que difiere para las formulaciones F4, F5 y F6, las cuales tienen dentro de su composición la enzima de pH 10 *Effectenz™ P100*. Adicionalmente, se observa que las formulaciones F1 y F3, tienen en común el surfactante aniónico SA 10 dentro de su composición, y en definitiva la mezcla surfactante de SA 10 y SA 20 presentan los mejores resultados como componentes de la formulación F1. Esta circunstancia permite establecer que la mezcla de surfactantes mencionada debe hacer parte de los componentes de la formulación del detergente enzimático.

Adicionalmente, las muestras lavadas se evaluaron mediante la disposición de estas a contraluz, para identificar ópticamente, cuál formulación presenta mejores resultados visuales, en cuanto a las manchas residuales de los lavados, cuando se usan productos comercialmente disponibles para el público en general.

Figura 5. Imágenes a contraluz de las muestras lavadas con las formulaciones con enzima pH 8 y pH 10.



En la figuras 5, se presentan las muestras a contraluz, donde se logra evidenciar que aquellas que presentan los resultados más discretos, es decir, presentan notorias manchas residuales, son las que están rotuladas como “Prueba 2 pH 8” y “Prueba 2 pH 10”. Adicionalmente, se corroboran los datos obtenidos en el análisis cuantitativo, donde se encuentra que la formulación 1, que fue utilizada para el lavado de la muestra rotulada como “Prueba 1 pH 8”, es la que presenta los mejores resultados en las pruebas de lavado.

3.1.3 Preparación del segundo grupo de formulaciones. Conocidos los resultados de la primera parte de la pre-experimentación, donde se varió el surfactante aniónico y el tipo de enzimas, se procedió a realizar la evaluación del comportamiento del surfactante no iónico dentro de las 5 opciones que se plantearon anteriormente. Para tal fin, se partió de la formulación que mejor resultó del primer grupo de formulaciones (F1) y se establecieron 4 nuevas formulaciones, puesto que en el primer grupo de formulaciones se tuvo en cuenta un surfactante no iónico (SX 05), razón por la cual, en la tabla 9, se muestra la formulación de la que se parte para la preparación del segundo grupo de formulaciones.

Tabla 9. Formulación detergente para el desarrollo del segundo grupo.

Componente	Composición (%)
Agua (Fijo)	55
Hidrótopo (Fijo)	8
Surfactante Aniónico 1 (Fijo)	9
Surfactante Aniónico 2 (Fijo)	13
Surfactante No Iónico (A variar)	14
Enzima (Fijo)	1
Cofactor (Fijo)	0,02

Tabla 10. Segundo grupo de formulaciones, variando los surfactantes no iónicos.

Componente	F7	F8	F9	F10
Agua	110 ml	110 ml	110 ml	110 ml
Hidrótopo	17,47 g	17,47 g	17,47 g	17,47 g
SA 10	18,15 g	18,15 g	18,15 g	18,15 g
SA 20	24,96 g	24,96 g	24,96 g	24,96 g
SX 06	27,20 g	-	-	-
SX07	-	27,20 g	-	-
SX 08	-	-	27,20 g	-
SX 09	-	-	-	27,20 g
CaCl₂	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g
Proteasas pH Neutro	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

El tratamiento seguido para la preparación y acondicionamiento este grupo de formulaciones, es el mismo realizado para la preparación del primer grupo.

3.1.4 Pruebas de lavado segundo grupo de formulaciones. Las pruebas de lavado de este segundo grupo de formulaciones, se evaluaron de la misma manera que el anterior. En primera instancia, se llevó a cabo el análisis gravimétrico, donde los resultados de tomar los pesos de las muestras antes y después de impregnar la sangre y su posterior lavado, se relacionan en la tabla 11.

Tabla 11. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para el segundo grupo de formulaciones.

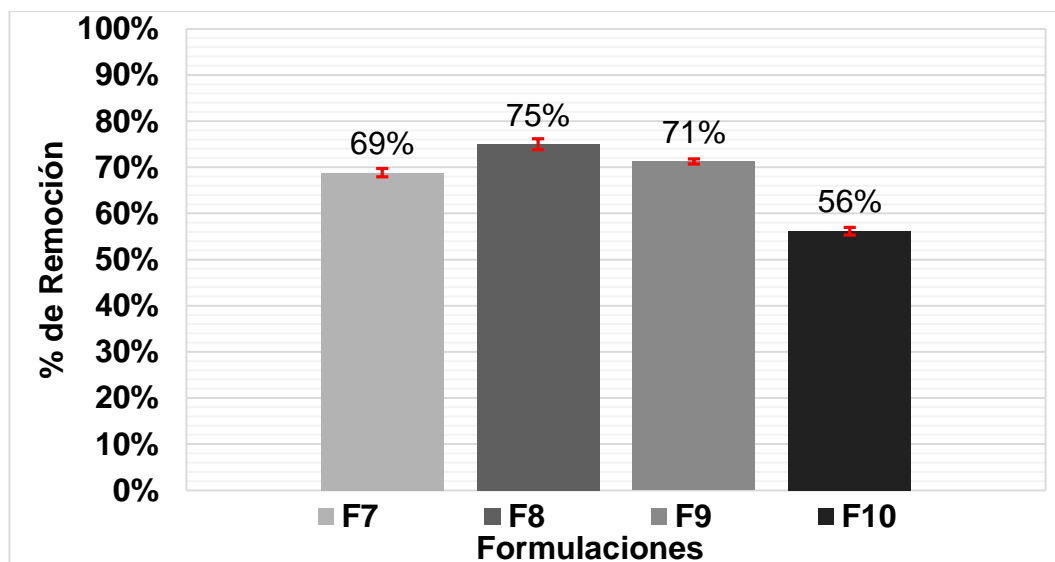
Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
7	2,56	3,33	2,80
8	2,57	3,25	2,74
9	2,56	3,29	2,77
10	2,58	3,31	2,90

Con los datos relacionados en la tabla 11, se aplica la ecuación (2) presentada anteriormente y se realiza el cálculo del porcentaje de remoción de sangre del segundo grupo de formulaciones, resultados que se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados del cálculo de los porcentajes de remoción para el segundo grupo de formulaciones.

Muestra	Formulación Utilizada	Porcentaje de Remoción
7	F7	69%
8	F8	75%
9	F9	71%
10	F10	56%

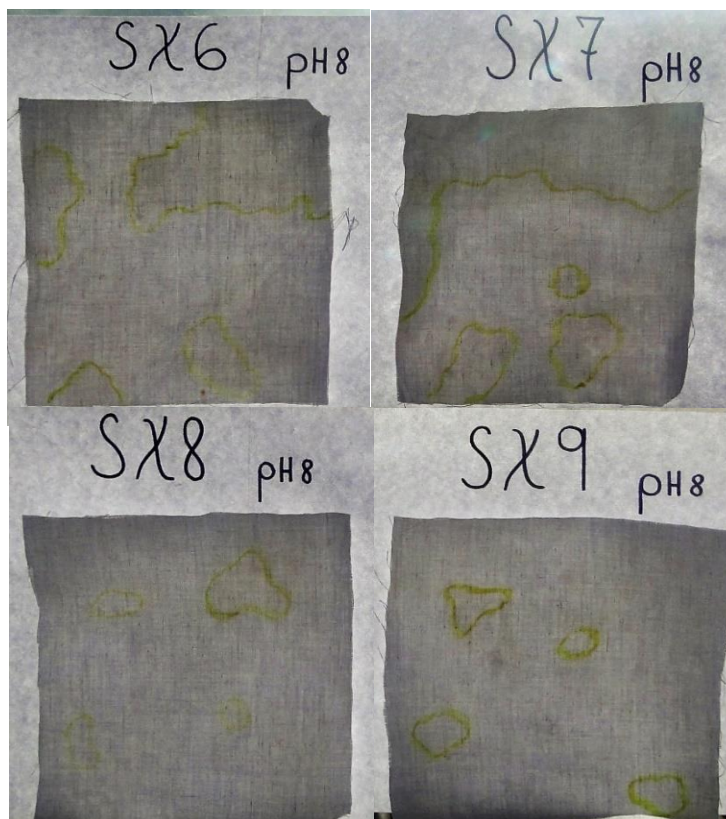
Gráfica 3. Porcentaje de remoción del segundo grupo de formulaciones. Las barras de error representan la desviación del valor de la media, basado en los duplicados de las muestras totales.



En la gráfica 3, se muestran gráficamente los resultados cuantitativos de la remoción de sangre del segundo grupo de formulaciones, los cuales son significativamente menores, en comparación con el primer grupo. Esta situación se puede presentar, debido a la composición química de los surfactantes no iónicos, puesto que, como se mostró anteriormente, se usan surfactantes sin grado de etoxilación (SX 06 y SX 07), con bajos niveles de etoxilación (SX 05) y altos niveles de etoxilación (SX 08 y SX 09). Las muestras lavadas con formulaciones que contienen surfactantes no iónicos sin ningún grado de etoxilación (F7 y F8) y con alto grado de etoxilación (F9 y F10) presentan similares rendimientos, aunque es posible evidenciar que cuando se aumenta el grado de etoxilación (de SX 05 a SX 08 y de SX 08 a SX 09), disminuye el porcentaje de remoción, debido a que al incrementarse el número de grupos etoxilados en la cadena etoxilada de los surfactantes no iónicos, decrece la adsorción del tensoactivo sobre los materiales, situación que causa la disminución en la detergencia³⁶ y corrobora que al usar niveles de etoxilación más bajos, se encuentran mejores resultados, como se comprobó en el primer grupo de formulaciones, donde se usó un surfactante no iónico de bajo nivel de etoxilación (SX 05) y se obtuvo un 95% de remoción.

³⁶ ALMAJER, Deisi. Formulaciones Detergentes Biodegradables. Tesis Doctoral. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2004, p 39.

Figura 6. Imágenes a contraluz de las muestras lavadas con las formulaciones del segundo grupo.

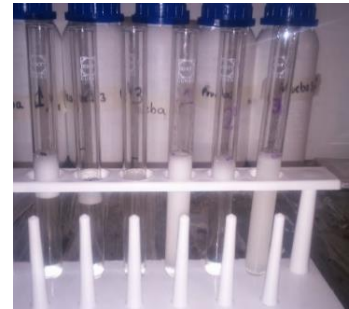


En la figura 6, se recopilan los resultados a contraluz de las muestras lavadas con el segundo grupo de formulaciones, donde se puede evidenciar y corroborar los bajos resultados cuantitativos obtenidos por estas formulaciones, donde se presentan en mayor medida, manchas residuales que en principio, se buscan eliminar con este producto. Por lo anterior, se encuentra que el surfactante no iónico que mejor resultado mostró es el SX 05, el cual fue usado en las preparaciones del primer grupo.

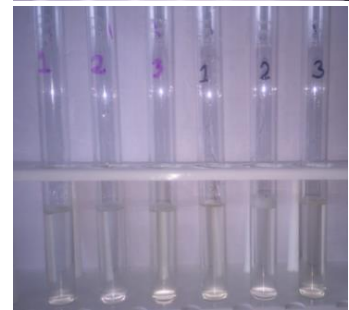
3.1.5 Pruebas de estabilidad. Esta prueba buscaba determinar la eficiencia del hidrótopo agregado en la formulaciones preparadas el cual, para este caso de estudio, corresponde a Dietilenglicol, cuya función dentro del detergentes es la de mantener el equilibrio de la emulsión y que se siguió de acuerdo a los protocolos estipulados en la empresa Saint Germain LTDA, realizando 5 seguimientos a las preparaciones, los cuales se llevaron a cabo a la hora de realizada la preparación, a las 24 horas, a las 48 horas y haciendo los seguimientos restantes en un periodo de tiempo prolongado, simulando un periodo de almacenamiento en estantería, los cuales corresponden a 30 días y finalmente a 60 días.

Cuadro 3. Seguimiento a la estabilidad de formulaciones preparadas.

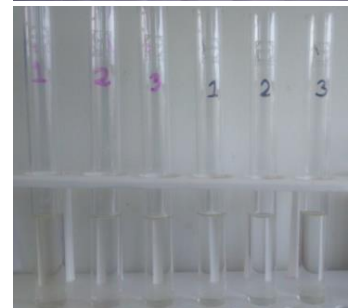
Control de estabilidad a la hora de preparación



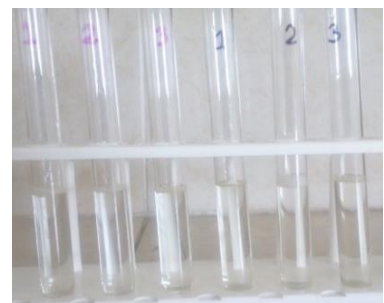
Control de estabilidad a 24 horas de la preparación



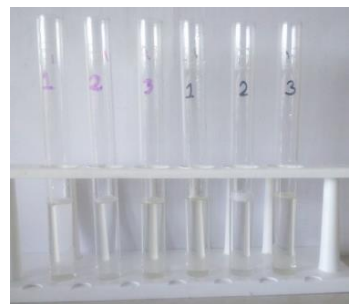
Control de estabilidad a 48 horas de la preparación



Control de estabilidad a 30 días de la preparación



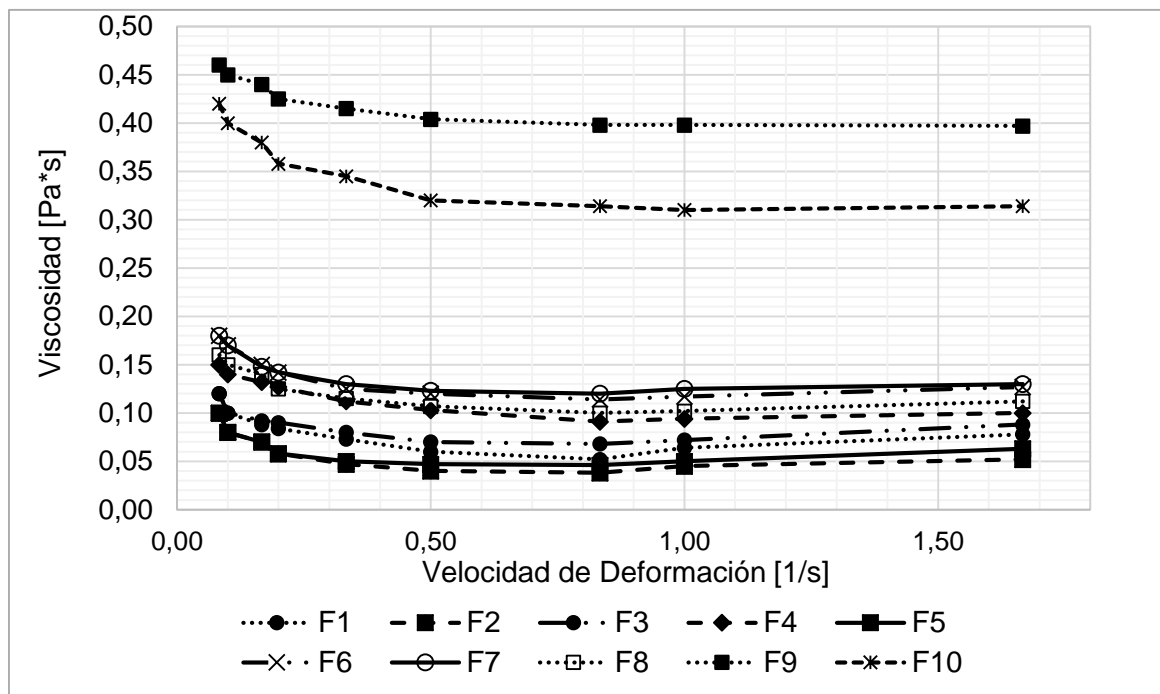
Control de estabilidad a 60 días de la preparación



Como se puede observar en cuadro 3, las formulaciones preparadas a la hora, se encuentran en un estado de acoplamiento y de formación de la emulsión, por lo que se pueden evidenciar 2 fases. Cuando han pasado 24 horas, se puede observar solamente 1 fase, donde se muestra con claridad, que la emulsión se ha formado completamente, dando como resultado un líquido traslucido con ligera coloración amarillosa, el cual se mantiene a lo largo de los seguimientos a través del tiempo mencionados, situación que indica la eficiente función del Dietilenglicol como sustancia que contribuye a la correcta solubilización de los surfactantes y demás componentes del detergente, manteniéndose estable en todo el seguimiento y conservando la propiedad de líquido traslucido.

3.1.6 Perfiles reológicos. Los perfiles reológicos se determinaron para los dos grupos de formulaciones preparadas, mostrándose en la gráfica 4, el perfil reológico del primer y segundo grupo de formulaciones preparadas.

Gráfica 4. Perfil reológico del primer y segundo grupo de formulaciones.

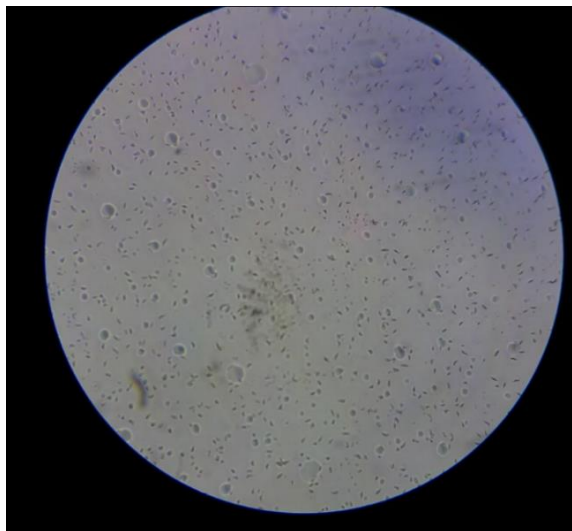


En la gráfica 4, se puede observar que en la región del gráfico donde se evalúan bajas velocidades de deformación, se presentan valores altos de viscosidad aparente y cuando se aumenta gradualmente la velocidad de deformación, la viscosidad tiende a la disminución, al punto que sin importar el valor de la deformación, los valores de viscosidad sufren pequeñas variaciones, característica que permite catalogarlo como un fluido no newtoniano de tipo pseudoplástico. Esta situación puede explicarse desde el reordenamiento en la orientación o disposición de las micelas de diferentes tamaños que se forman por

la mezcla de surfactantes con la variación de la velocidad de deformación³⁷. En cuanto a la variación del perfil de viscosidad de una formulación a otra, se puede atribuir a la composición de cada una en sí, puesto que aquellas que presentan niveles más altos de viscosidad (F9 y F10), están compuestas por surfactantes no iónicos de alto grado de etoxilación (SX 08 y SX 09), situación que además se ve afectada por el porcentaje de agua que contienen las materias primas al momento de ser incorporadas en cada una de las formulaciones. En cuanto a la influencia de las enzimas en el estudio reológico, se puede determinar que estas no tienen mayor influencia en los resultados obtenidos, puesto que las enzimas hacen parte del agregado molecular de las micelas y no presentan una influencia determinante en la viscosidad de los detergentes³⁸.

3.1.7 Fotomicrografía. Después de determinar la estabilidad de las formulaciones preparadas, fue preciso comprobar la formación micelar dentro del detergente, razón por la cual, se tomó la formulación ganadora de las pruebas de lavado anteriores y la solución enzimática y se realizó esta comprobación con el uso de un microscopio con lente de 40x y 100x. Estas evaluaciones se presentan en las figuras 7 y 8.

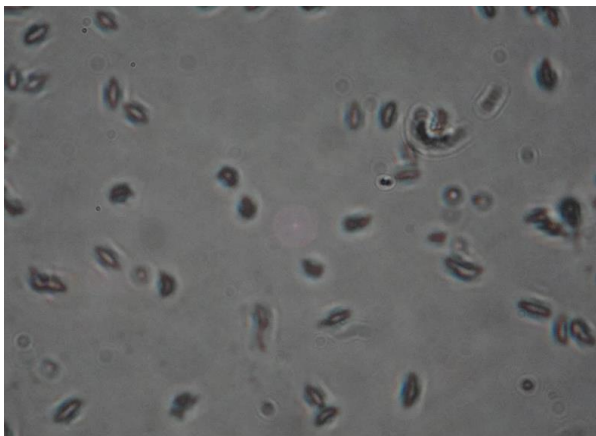
Figura 7. Fotomicrografía a la formulación detergente con lente 40x.



³⁷ ORTEGA, Mario. Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. Tesis Doctoral en ingeniería química. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2009. p 66.

³⁸ BOCHO-JANISZEWSKA, Anita. Effect of selected enzymes on performance of liquid laundry detergents. University of Technology and Humanities in Radom, Faculty of Materials Science and Design, Department of Chemistry. Radom, Poland.

Figura 8. Fotomicrografía a la solución enzimática con lente 100x.



En las figuras 7 y 8, se puede observar que en las dos muestras se presenta una correcta formación micelar, de parejo tamaño y de apropiada distribución a lo largo de las muestras, propiedad importante, porque al evitar la aglomeración de estas, se evita la precipitación y una posible separación de fases, situación que comprueba la importante función del hidrótopo dentro de la formulación. Adicionalmente, se puede evidenciar en la figura 8, la formación de microcápsulas poliméricas de geometría esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro. Dicha encapsulación se genera por la formación de membranas semipermeables, no permanentes, producto del recubrimiento que hacen los surfactantes, dando como resultado la obtención de micelas reversas, las cuales permanecen estables en reacciones enzimáticas llevadas a cabo en disolventes orgánicos³⁹, razón por la cual, hace que las enzimas permanezcan estables en la solución y en el detergente, evitando el desdoblamiento de su estructura y asegurando que la actividad enzimática no se vea afectada por las demás sustancias pertenecientes a la formulación.

3.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En lo concerniente al diseño experimental, es preciso tener en cuenta la información obtenida de la pre-experimentación, en la cual se determinó la base de la formulación a usar en el detergente, además del tipo de surfactantes a usar y la enzima que mejor se acopló a estos. A continuación, se presenta el planteamiento del diseño experimental y su desarrollo, aclarando que los procedimientos y pruebas que se describieron en los puntos anteriores, se repiten en este numeral para las diferentes formulaciones que arrojen la aplicación de este método.

³⁹ ALFARO Yohana. Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de desulfotalea psychrophila. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense De Madrid. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 2012. p 19-20.

Para dar inicio al diseño, se requiere el análisis de las variables o factores que intervienen en el proceso, para lo cual, se selecciona el modelo propuesto por McLean & Anderson conocido como *Vértices Extremos*⁴⁰, el cual es uno de los métodos más pertinentes para la evaluación de formulaciones donde se tienen intervalos de composición y donde no es necesario la realización de réplicas. Este método se desarrolla para la realización de experimentos que involucran mezclas, cuando varios factores requieren limitarse, de acuerdo a experiencias previas, para así obtener los niveles de factores adecuados, que, para este caso, los factores son los componentes de la formulación y los niveles hacen referencia al porcentaje que estos factores deben tener, en un rango porcentual de 0 a 100. Teniendo en cuenta lo anterior, se desarrolla el método propuesto, con la ayuda del software estadístico para el análisis de datos *Minitab 17*⁴¹, donde se ingresan los datos que corresponden al listado de componentes de la formulación detergente y los rangos de composición de cada uno de estos (tabla 13), excluyendo de este análisis a la enzima y al cloruro de calcio. El primero se excluye porque la intención de este diseño de experimentos es establecer la mejor composición del detergente, lo que implica que se debe garantizar en primera medida, que la matriz de sustancias activas, parte del detergente encargado de la remoción de la sangre, sea la que mejores resultados presente, objetivo de este diseño, y a la cual, la posterior incorporación de la enzima pueda potenciar para mejorar su capacidad de remoción final, razón por la cual se tomó la decisión de apartarla del diseño. Finalmente, la exclusión del cloruro de calcio se fundamenta en que éste compuesto hace parte de la solución que mantiene estable a las enzimas dentro de la formulación, y como en esta parte de la experimentación no se requiere la incorporación de las enzimas por las razones anteriormente expuestas, no es necesario tenerlo en cuenta en el diseño de experimentos.

Tabla 13. Componentes y composiciones ingresados en el software.

	Componente	Composición Mínima (%)	Composición Máxima (%)
1	Agua	50	60
2	Hidrótopo	1	10
3	SA 10	15	20
4	SX 05	5	15
5	SA 20	5	15

⁴⁰ ANDERSON, Virgil L. MCLEAN, Robert A. Design of Experiments: A Realistic Approach. Vol. 5. Marcel Dekker Inc. 1974. p 342.

⁴¹ Minitab 17 para Windows 10. Versión Multilanguage. Minitab ®. [Programa informático descargable]. Disponible en <<http://www.minitab.com/es-mx>>

El software en primera instancia, propone 51 formulaciones (Anexo C), de las cuales se eliminan aquellas opciones que presentan valores que no pertenezcan al rango de composición determinado para cada componente u opciones que se encuentren repetidas, dejando así 14 opciones como resultado del diseño (tabla 14).

Tabla 14. Formulaciones resultantes tras aplicar el diseño de experimentos.

Form.	Ensayo	Agua (%)	Hidrótopo (%)	SA 10 (%)	SX 05 (%)	SA 20 (%)
1	6	56,26	3,57	18,22	12,14	6,81
2	9	56,26	7,93	15,79	5,35	11,66
3	12	56,26	7,93	18,22	9,23	5,35
4	14	56,26	5,02	18,22	5,35	12,14
5	18	56,26	7,93	15,79	11,66	5,35
6	19	56,26	7,45	15,79	5,35	12,14
7	21	56,26	3,57	15,79	12,14	9,23
8	24	55,78	7,93	15,79	5,35	12,14
9	27	56,26	7,45	15,79	12,14	5,35
10	37	56,26	3,57	18,22	6,81	12,14
11	39	56,26	7,93	18,22	5,35	9,23
12	41	56,26	3,57	15,79	9,23	12,14
13	45	56,26	5,02	18,22	12,14	5,35
14	50	55,78	7,93	15,79	12,14	5,35

3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Conocidas las formulaciones resultantes del diseño de experimentos, se procedió a realizar todos los tratamientos descritos anteriormente para este grupo de formulaciones experimentales.

3.3.1 Preparación de formulaciones experimentales. En la tabla 15, se presentan las 14 formulaciones que se prepararon y donde se pueden evidenciar la variación de proporciones de los surfactantes a usar, donde en algunas de estas la cantidad de surfactantes aniónicos es mayor a la del surfactante no iónico y viceversa, situación que es favorable en la búsqueda de las implicaciones de la cantidad de estos componentes en la formulación. Adicionalmente, las cantidades que se presentan en gramos, corresponden a una preparación de 150 ml de detergente

Tabla 15. Composición de las formulaciones experimentales.

Formulación Experimental	Agua (g)	Hidrótoto (g)	SA 10 (g)	SX 05 (g)	SA 20 (g)
FE 1	84,39	6,00	20,03	17,87	10,72
FE 2	84,39	13,33	25,40	7,88	18,36
FE 3	84,39	13,33	20,03	13,59	8,43
FE 4	84,39	8,44	20,03	7,88	19,13
FE 5	84,39	13,33	25,40	17,16	8,43
FE 6	84,39	12,52	25,40	7,88	19,13
FE 7	84,39	6,00	25,40	17,87	14,54
FE 8	83,66	13,33	25,40	7,88	19,13
FE 9	84,39	12,52	25,40	17,87	8,43
FE 10	84,39	6,00	20,03	10,02	19,13
FE 11	84,39	13,33	20,03	7,88	14,54
FE 12	84,39	6,00	25,40	13,59	19,13
FE 13	84,39	8,44	20,03	17,87	8,43
FE 14	83,66	13,33	25,40	17,87	8,43

3.3.2 Pruebas de lavado formulaciones experimentales. El lavado de las muestras con el grupo de formulaciones experimentales se llevó a cabo siguiendo los mismos procedimientos de las pruebas realizadas en la pre-experimentación, además de realizar el análisis gravimétrico con los pesos de las muestras antes y después de la impregnación de la sangre y su posterior lavado y que están recopilados en la tabla 16.

Tabla 16. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado con las formulaciones experimentales.

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
1	2,54	3,46	3,05
2	2,53	3,48	2,93
3	2,53	3,54	2,99

Tabla 16. (Continuación)

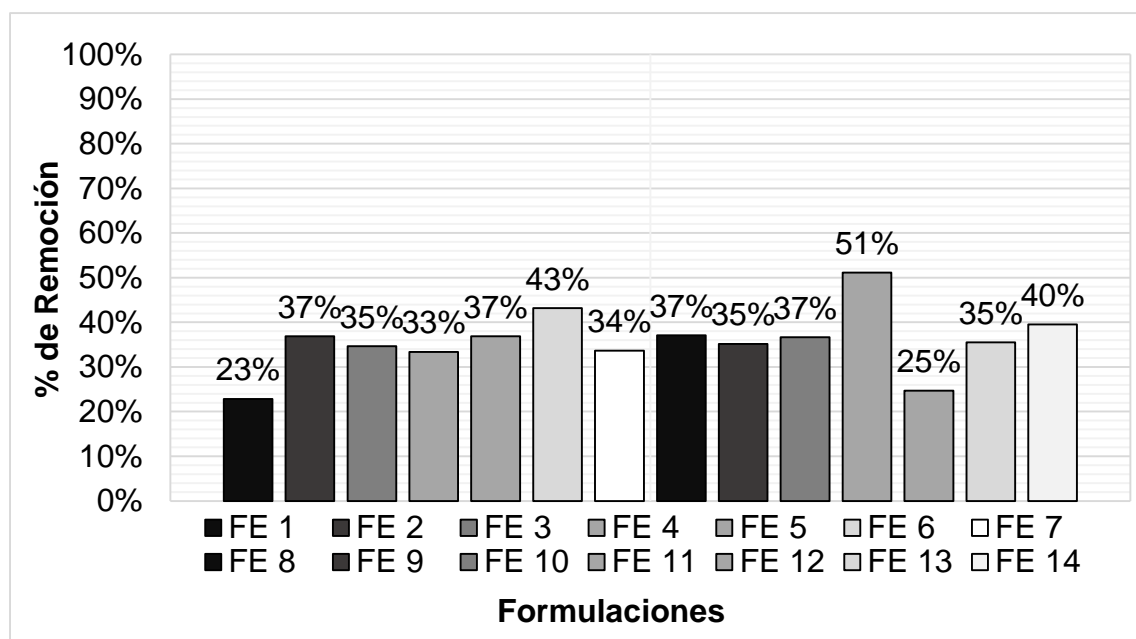
Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
4	2,52	3,45	2,94
5	2,55	3,50	2,95
6	2,52	3,47	2,86
7	2,51	3,46	2,94
8	2,54	3,43	2,90
9	2,50	3,41	2,89
10	2,51	3,52	2,95
11	2,50	3,40	2,74
12	2,55	3,44	3,02
13	2,55	3,48	3,01
14	2,52	3,38	2,84

Usando los datos contenidos en la tabla 16, se realiza la aplicación de la ecuación (2) calculándose así el porcentaje de remoción de sangre de estas formulaciones experimentales y cuyos resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Porcentajes de remoción calculados para las formulaciones experimentales.

Muestra	Formulación Utilizada	Porcentaje de Remoción
1	FE 1	23%
2	FE 2	37%
3	FE 3	35%
4	FE 4	33%
5	FE 5	37%
6	FE 6	43%
7	FE 7	34%
8	FE 8	37%
9	FE 9	35%
10	FE 10	37%
11	FE 11	51%
12	FE 12	25%
13	FE 13	35%
14	FE 14	40%

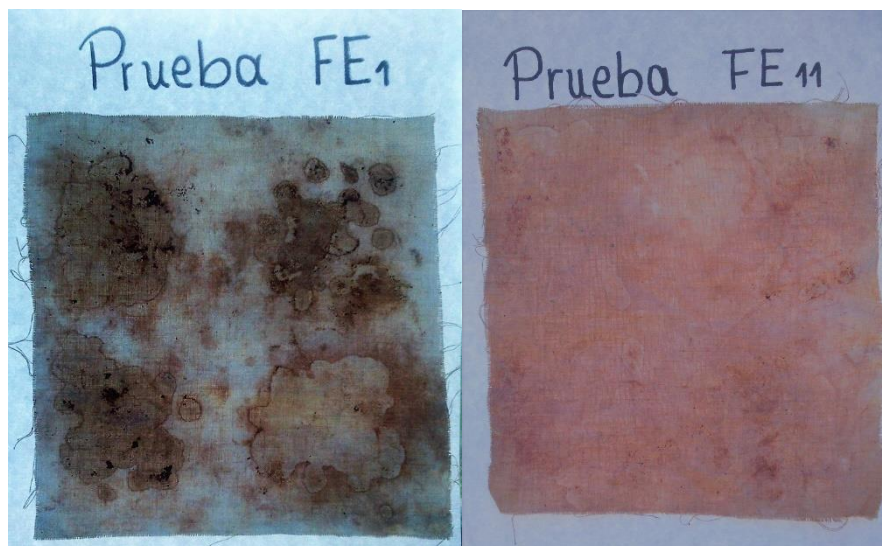
Gráfica 5. Resultados gráficos de la remoción de las formulaciones experimentales.



Al observar los resultados de la gráfica 5, se puede evidenciar que la formulación que alcanzó el mayor porcentaje de remoción es la formulación experimental 11 (FE 11) con una marcada diferencia respecto al resto de formulaciones. Al analizar este resultado, se encuentra que aquellas formulaciones que alcanzaron los porcentajes más altos (37%, 40%, 43% y 51%), presentan los mayores valores en cuanto a la proporción de la matriz surfactante, es decir, la relación entre la cantidad de surfactantes aniónicos con la cantidad de surfactante no iónico, alrededor de 4,5 a 1, situación que puede explicar el que estas formulaciones presentaran esos porcentajes. Adicionalmente, la formulación 11 presenta un alto contenido de hidrótopo, en comparación de las otras formulaciones que presentaron porcentajes altos, aunque no en la misma medida, situación que se puede explicar en el sentido de la función que cumple el hidrótopo en la formulación, donde además de aumentar la solubilidad de los surfactantes y ofrecer estabilidad de la emulsión, actúa como agente antiredepositante, propiedad que favorece en gran medida a la remoción que ofrece la matriz surfactante.

Al contrastar los resultados de los análisis gravimétricos con la observación de las muestras lavadas a contraluz, se corrobora la poca remoción obtenida en las pruebas de lavado y donde además, la formulación experimental 11 (FE 11) que alcanzó la remoción más alta en el anterior análisis, presentó uno de los mejores resultados visuales, en comparación con la formulación experimental 1 (FE 1), la cual presentó los peores resultados gravimétricos y a contraluz, como se muestra en la figura 9.

Figura 9. Comparación de los resultados a contraluz entre la formulación experimental 1 y la formulación experimental 11.

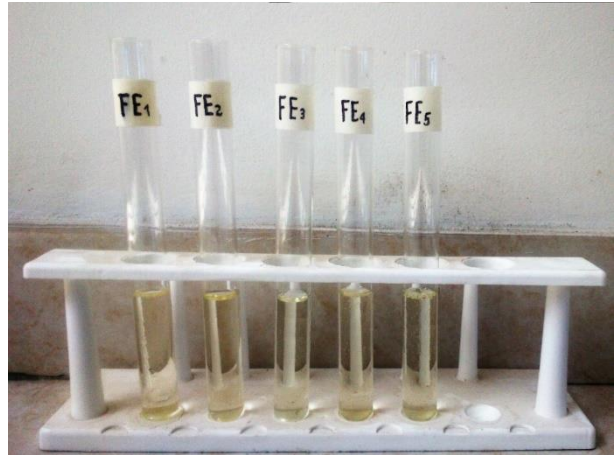


En la figura 9 se evidencia como en la muestra lavada con la formulación FE 1, persisten las manchas de sangre de la misma manera en que fueron dispuestas, a diferencia de la muestra lavada con la formulación FE 11, en donde si bien, persiste una mancha, esta no es comparable con la muestra anterior, puesto que la muestra lavada con la formulación FE 11 logra remover inicialmente una mayor proporción de sangre impregnada. Por lo anterior, la formulación experimental 11, se convierte en aquella preparación que continúa en la fase experimental.

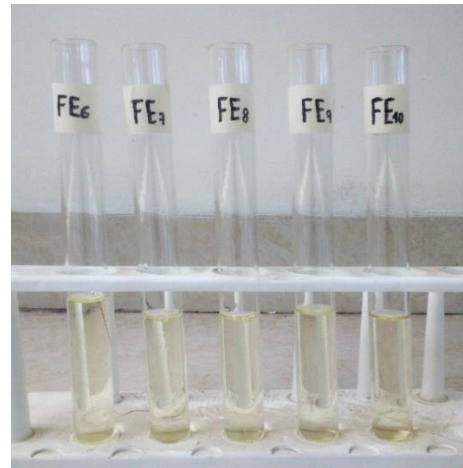
3.3.3 Prueba de estabilidad formulaciones experimentales. La estabilidad de las formulaciones ha sido una propiedad que se ha establecido para todas las formulaciones a lo largo de este trabajo, donde se encontró que la incorporación del Dietilenglicol como hidrótopo, es un factor determinante para lograr que la emulsión permanezca estable. En tal medida, en el cuadro 4, se muestran el seguimiento de la estabilidad de las formulaciones experimentales en el control a 30 días de ser preparadas.

Cuadro 4. Seguimiento a 30 días de la estabilidad de las formulaciones experimentales.

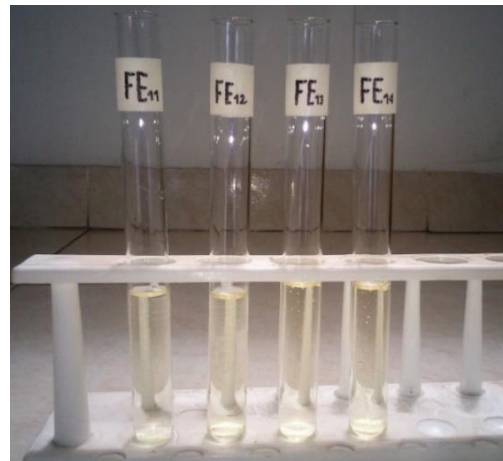
Seguimiento de la estabilidad de las formulaciones experimentales 1, 2, 3, 4 y 5



Seguimiento de la estabilidad de las formulaciones experimentales 6, 7, 8, 9 y 10



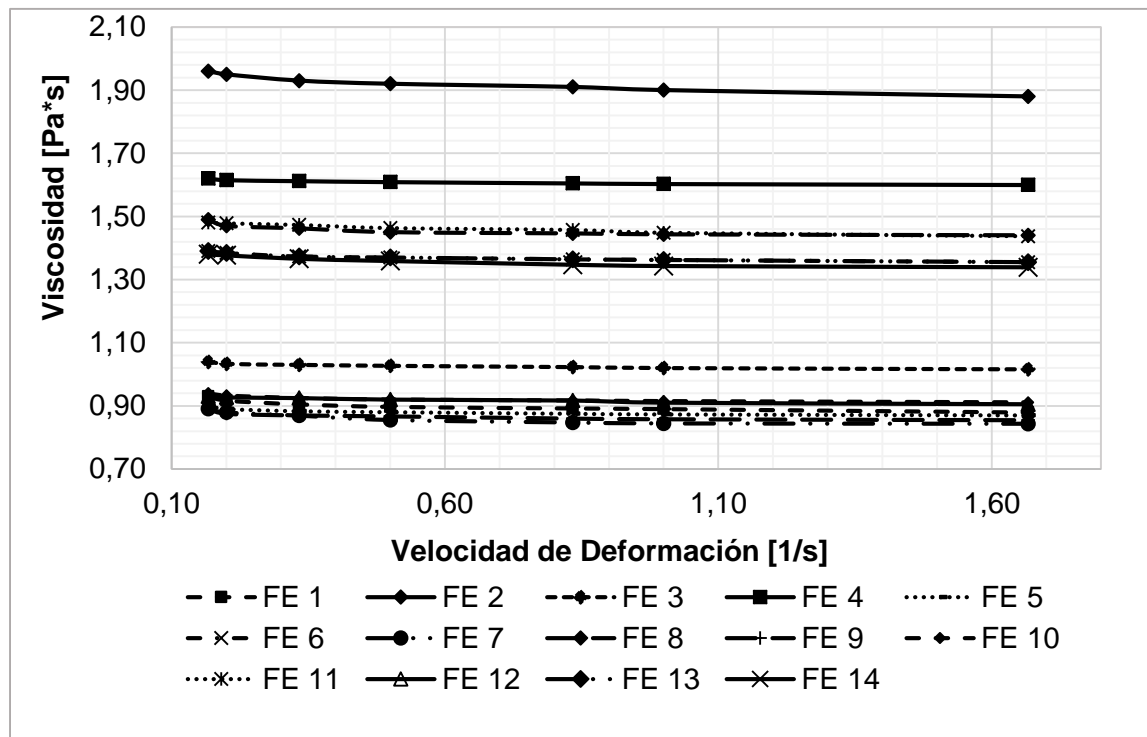
Seguimiento de la estabilidad de las formulaciones 11, 12, 13 y 14



En el cuadro 4, se comprueba que las formulaciones preparadas siguen presentando la estabilidad buscada a lo largo de la experimentación, conservando la propiedad de líquido translucido y de coloración amarillosa.

3.3.4 Perfiles reológicos. Siguiendo con el análisis reológico de las formulaciones experimentales, los perfiles viscosos fueron determinados para cada una de las preparaciones, los cuales se muestran en la gráfica 6.

Gráfica 6. Perfiles reológicos de las formulaciones experimentales.



En la gráfica 6, se puede observar que cada una de las 14 formulaciones mantiene la característica de comportamiento de fluido no newtoniano de tipo pseudoplástico establecido con el perfil reológico de los 2 primeros grupos de formulaciones preparadas. Aquellas formulaciones que presentan valores de viscosidad por encima 1,40 Pa*s (FE 2, FE 4, FE 6 FE, 8 FE 10 y FE 11) tienen dentro de su composición una mayor proporción del surfactante aniónico SA 20 respecto al surfactante SX 05. Cuando la proporción del surfactante no iónico aumenta, los valores de viscosidad tienden a disminuir, como es el caso de las formulaciones restantes, las cuales presentan valores de viscosidad menores a 1,40 Pa*s. Este comportamiento se presenta, por el aumento de la dilución del surfactante SA 20 cuando la cantidad de surfactante no iónico se incrementa, situación que favorece la adición de mayores agregados moleculares debido a la deshidratación de las cabezas polares de los tensoactivos y la disminución de las fuerzas repulsivas de estas, aumentando la formación micelar y a su vez,

permitiendo el incremento de los niveles de agua en las formulaciones, causal del decrecimiento de la viscosidad.

3.3.5 Adición y variación de las cantidades enzimáticas en el detergente.

Teniendo establecida la composición final del producto detergente, donde se determinaron los mejores componentes y las cantidades adecuadas de los surfactantes a usar, es momento de evaluar las concentraciones de enzimas que permiten potenciar la función de limpieza y remoción de sangre de la matriz de sustancias activas. Para tal efecto, la formulación experimental 11, aquella que presentó los mejores resultados en la remoción, se usó para analizar 5 diferentes concentraciones enzimáticas, las cuales se prepararon y se evaluaron mediante pruebas de lavado. Dichas formulaciones preparadas, variando las concentraciones de enzima, se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Formulaciones detergentes variando la concentración de enzima.

Formulación	Porcentaje de enzima Utilizado
E 0.1	0,1 %
E 0.5	0,5 %
E 1.0	1,0 %
E 1.5	1,5 %
E 2.0	2,0 %

Siendo preparadas estas formulaciones de acuerdo las cantidades que componen la formulación ganadora de las pruebas anteriores, se llevan a cabo las pruebas de desempeño, cuyos resultados se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado para las formulaciones con diferentes concentraciones de enzima.

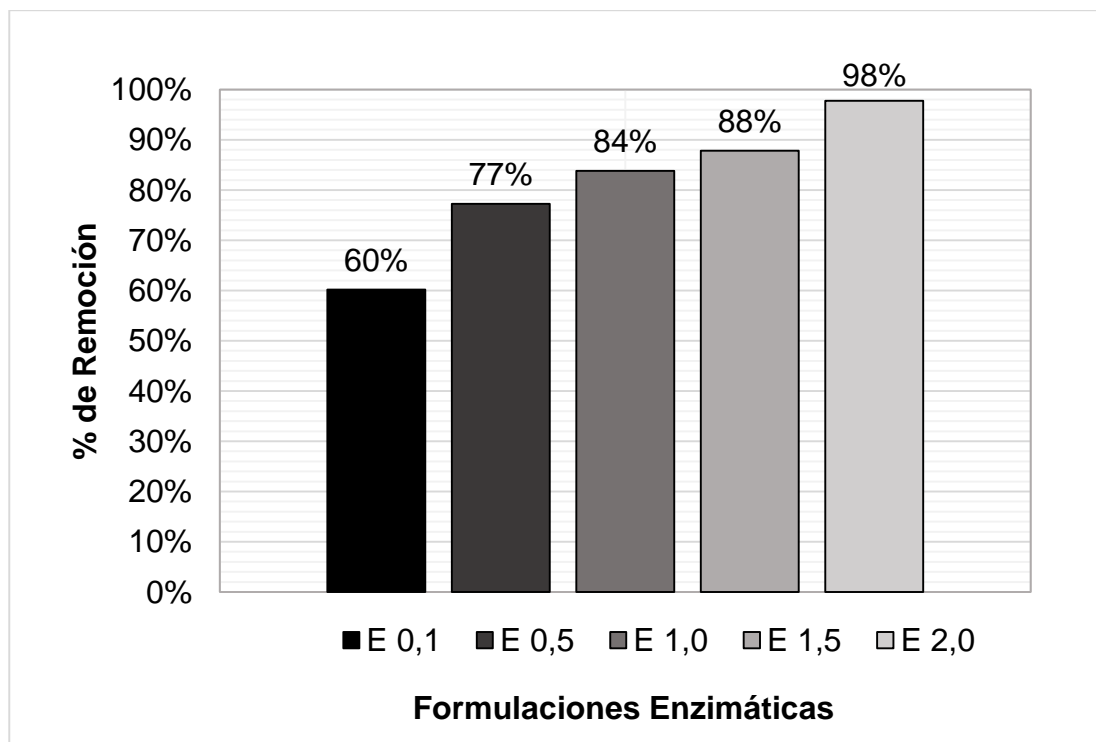
Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
1	2,59	3,67	3,02
2	2,54	3,55	2,77
3	2,46	3,57	2,64
4	2,57	3,72	2,71
5	2,37	3,71	2,40

Adicionalmente, con los valores consignados en la tabla 19, se realizó el cálculo del porcentaje de remoción de las formulaciones con diferentes concentraciones de enzima, obteniéndose los resultados descritos en la tabla 20.

Tabla 20. Porcentajes de remoción calculados para las formulaciones enzimáticas.

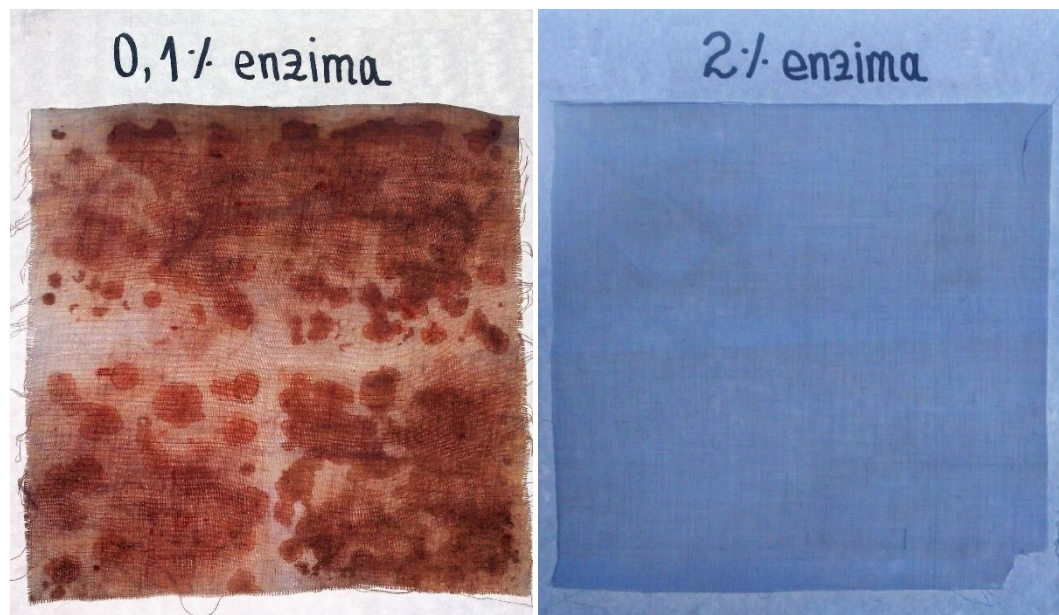
Muestra	Formulación Utilizada	Porcentaje de Remoción
1	E 0,1	60%
2	E 0,5	77%
3	E 1,0	84%
4	E 1,5	88%
5	E 2,0	98%

Gráfica 7. Resultados gráficos de la remoción de las formulaciones enzimáticas.



Como se evidencia en la gráfica 7, con la adición de enzimas a la formulación, notoriamente se incrementa la remoción desde el punto de vista gravimétrico, puesto que en las pruebas realizadas a las formulaciones donde no se usó ningún porcentaje de enzima, se logró un máximo de remoción del 51%, y ahora, agregando una pequeña concentración, la cual corresponde al 0,1%, este porcentaje se incrementa al 60%. Es claro entonces que, la adición de las enzimas proteasas representa un factor diferencial importante y no solo por ser un componente más en la formulación, sino por la efectiva función de potenciamiento en la detergencia del producto. A su vez, los resultados comprueban que el aumento en la concentración de la enzima, permite lograr mejores porcentajes en la remoción.

Figura 10. Comparación de las formulaciones E 0.1 y E 2.0 a contraluz.



Cuando se disponen las muestras lavadas con los detergentes enzimáticos a la prueba en contraluz, como se muestran en la figura 10, es notoria la diferencia que se presenta cuando las muestras se tratan con detergentes con bajas concentraciones de enzima, la remoción que se percibe visualmente es igualmente baja, caso contrario en la muestra lavada con la formulación de mayor concentración enzimática, puesto que presenta muy buenos resultados visuales, logrando llegar a niveles favorables en la remoción.

3.3.6 Comparación del producto con otros detergentes. Una vez logrado el detergente líquido enzimático, capaz de remover sangre en altos porcentajes, es preciso comparar su funcionamiento con productos que actualmente cumplen con la función de remover, entre otras sustancias, aquellas que posean carácter proteico, incluida la sangre. Estos productos, objeto de comparación, se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Productos disponibles para ser comparados.

Producto	Uso
Detergente 1 (D1)	Hospitalario
Detergente 2 (D2)	Hospitalario
Detergente 3 (D3)	Doméstico (Extranjero)
Detergente 4 (D4)	Doméstico

La consecución de los detergentes de uso hospitalario se realizó, mediante una visita al departamento de limpieza del Hospital de Kennedy en Bogotá, donde concedió a esta investigación, una muestra de cada detergente de uso regular dentro del centro hospitalario, razón por la cual, no es posible determinar la composición de estos, situación similar a los productos de uso doméstico, uno de ellos es de fabricación y uso en el extranjero (D3) mientras que el restante es un producto importado y cuyas etiquetas no proporcionan información clara sobre si estos productos contienen algún tipo de enzimas, solo se limitan a describir con claridad su función de remoción de sangre.

Con los productos detergentes anteriormente descritos, se realiza una prueba de lavado, de la misma manera en que han sido desarrolladas a lo largo de este trabajo y analizadas bajo granulometría y observación a contraluz. En la tabla 21 se muestran los datos obtenidos para la evaluación por gravimetría.

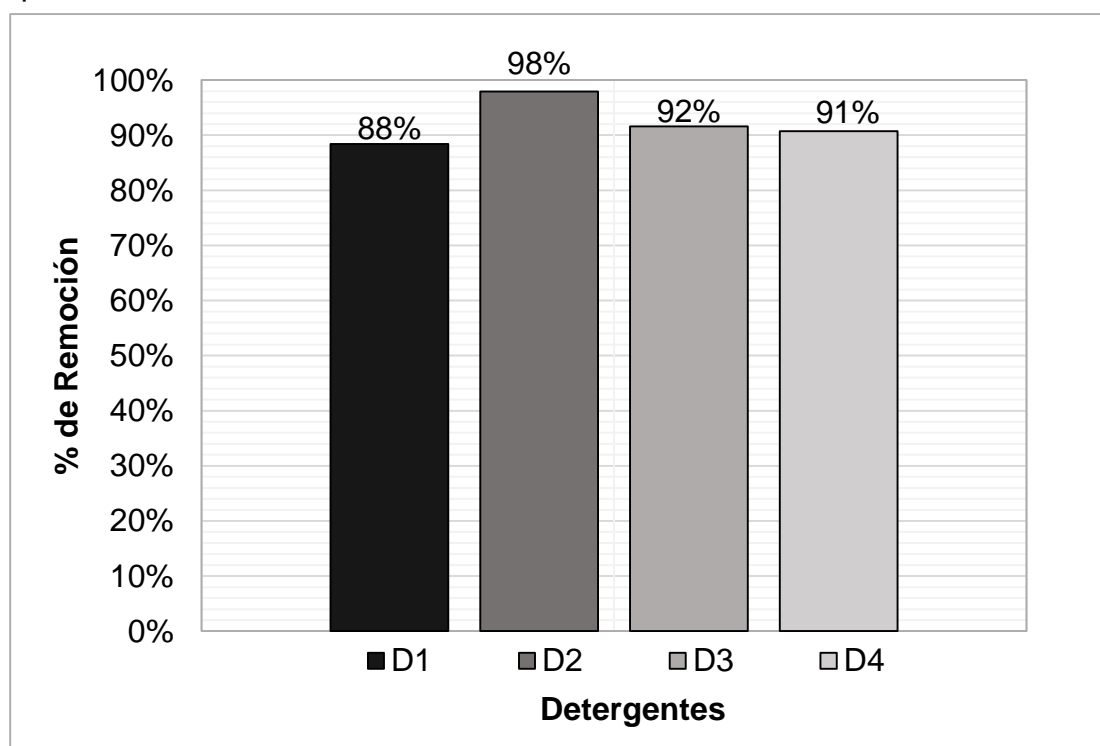
Tabla 21. Peso de las muestras antes y después de agregar sangre y posterior lavado con los detergentes de comparación.

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso con Sangre (g)	Peso después del lavado (g)
1	2,61	3,47	2,71
2	2,50	3,47	2,52
3	2,49	3,44	2,57
4	2,46	3,43	2,55

Tabla 22. Porcentajes de remoción calculados para los detergentes de comparación.

Muestra	Detergente Utilizado	Porcentaje de Remoción
1	D1	88%
2	D2	98%
3	D3	92%
4	D4	91%

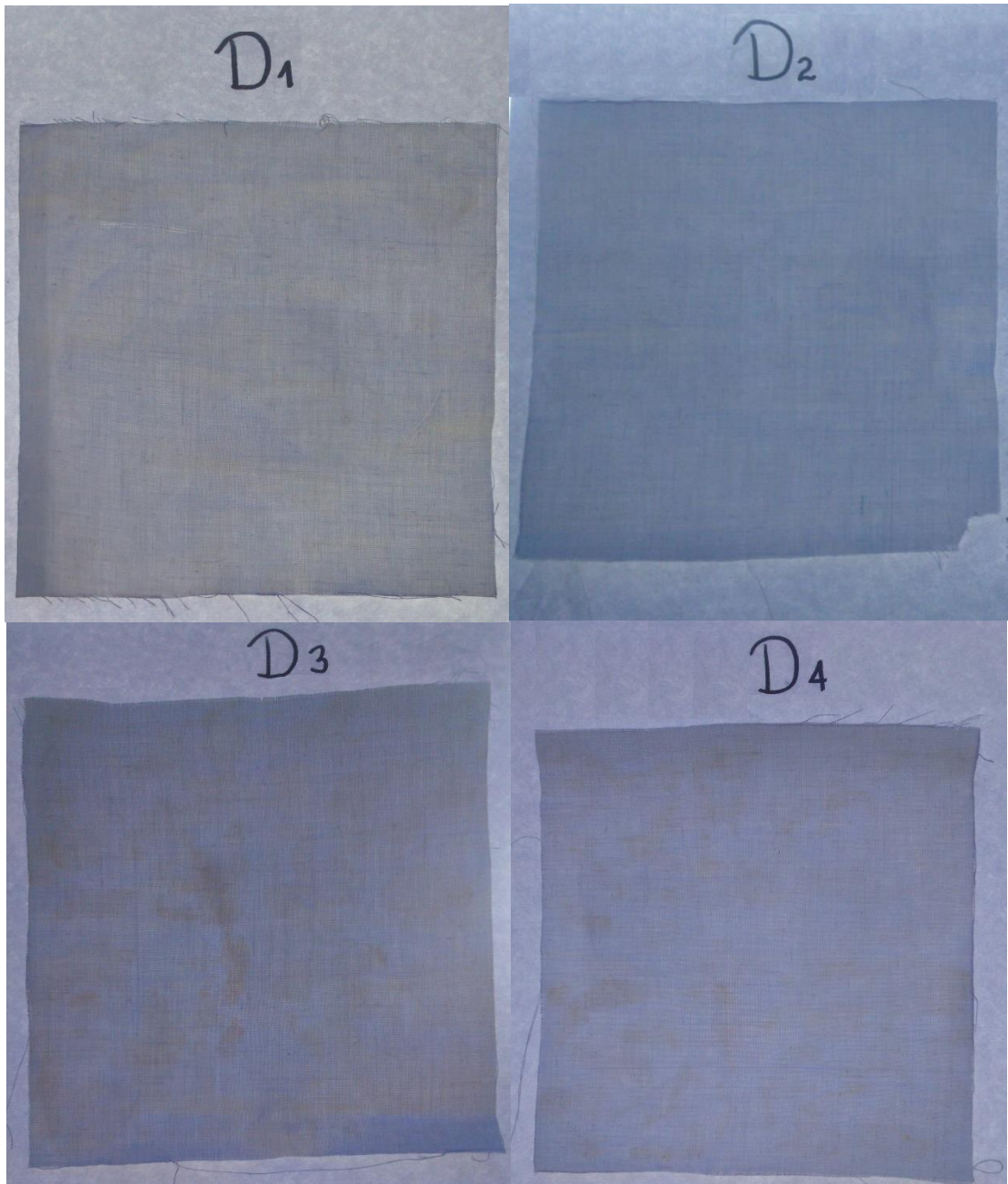
Gráfica 8. Resultados gráficos de la remoción de los detergentes de comparación.



Como se observa en la gráfica, los productos que se usaron como punto de comparación para el detergente enzimático resultante de esta investigación, presentan un alto desempeño en la remoción de sangre, logrando porcentajes considerablemente altos, valores a los cuales, el detergente enzimático del presente trabajo logró equiparar.

Adicionalmente, en la figura 11, se observan las muestras lavadas a contraluz y se logra comprobar visualmente, los buenos resultados obtenidos en el análisis cuantitativo.

Figura 11. Resultados a contraluz de las muestras lavadas con los detergentes de comparación.



3.3.7 Análisis por espectrofotometría. Una vez obtenidos los resultados de las pruebas de lavado, donde se determinó el detergente de comparación que mejores resultados tuvo en la remoción de sangre (D2), se usó la muestra lavada con este y la muestra lavada con el detergente enzimático para el análisis por espectrofotometría, para determinar de acuerdo a la absorbancia, cuál de estos detergentes logró mejores resultados. Las lecturas realizadas para cada muestra, se presentan en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la absorbancia a 480 nm.

Muestra	Detergente usado	Absorbancia
1	Hospitalario D2	0,793
2	Detergente Enzimático	0,016

Como se muestra en la tabla 23, los resultados obtenidos por las muestras son significativamente bajos, siendo el resultado alcanzado por el detergente enzimático producido tras esta investigación el más bajo y de acuerdo con lo postulado por la ley de Lambert-Beer, que expresa que la absorbancia es directamente proporcional con la concentración, se puede concluir que la muestra lavada con el detergente enzimático, presenta una menor concentración de sangre en sus fibras, consecuencia de un lavado más eficiente con el detergente enzimático, logrando una mayor remoción de la sangre.

4. ESPECIFICACIONES DEL PROCESO PRODUCTIVO DEL DETERGENTE

Los procesos productivos se fundamentan en la conversión de materias primas, en productos o sub-productos que harán parte de procesos adyacentes y que en su generalidad, constan de 3 etapas: la entrada o recepción, el proceso de transformación y la salida.

Para el caso del proceso productivo del detergente enzimático, se estipulan de igual manera, las 3 etapas mencionadas, donde la entrada hace referencia a la recepción y adecuación de las materias primas, la transformación implica la conversión de las materias primas mediante operaciones unitarias y la salida, la obtención del producto deseado.

4.1 MATERIAS PRIMAS

Luego de realizada la experimentación, se logró determinar las sustancias y las composiciones que mejores resultados permiten al momento de remover sangre de fibras textiles del algodón y poliéster, las cuales se presentan en la tabla 24 y donde el conocimiento de las materias primas hace parte de la primera etapa del proceso de producción, donde acondicionan las sustancias, realizando el pesaje de las cantidades, según la cantidad total que se requiera preparar para posteriormente, ser incorporadas en la segunda etapa del proceso.

Tabla 24. Formulación del detergente enzimático.

Insumo	Composición
Agua	56,26 %
Dietilenglicol	7,93 %
SA 10	18,22 %
SX 05	5,35 %
SA 20	9,23 %
Enzima	2,00 %
Cloruro de Calcio	1,00 %

4.2 TRANSFORMACIÓN

Para poder realizar la transformación de las sustancias presentadas anteriormente, en un detergente capaz de remover sangre de las fibras textiles de algodón-poliéster, se debe realizar la operación unitaria de mezclado de los componentes, a través del uso de un equipo que de agitación durante un tiempo estipulado.

4.2.1 Equipos. Como la producción del detergente requiere el mezclado de los componentes, es necesario contar con un sistema que permita que esta operación unitaria sea llevada a cabo, razón por la cual, se acondiciona un Beaker de 400 ml de capacidad, 7 cm de altura y 7,7 cm de diámetro como tanque y el sistema de agitación se configura con un agitador IKA de motor monofásico a 115 V y 60 Hz, con propela de superflujo de 4 aspas.

4.2.2. Tiempos de agitación. La incorporación de los componentes se realiza con una agitación de 300 RPM, donde las sustancias que hacen parte de la formulación se adicionan una a una con los tiempos de agitación determinados en la tabla 25, a temperatura ambiente (14 °C aproximadamente).

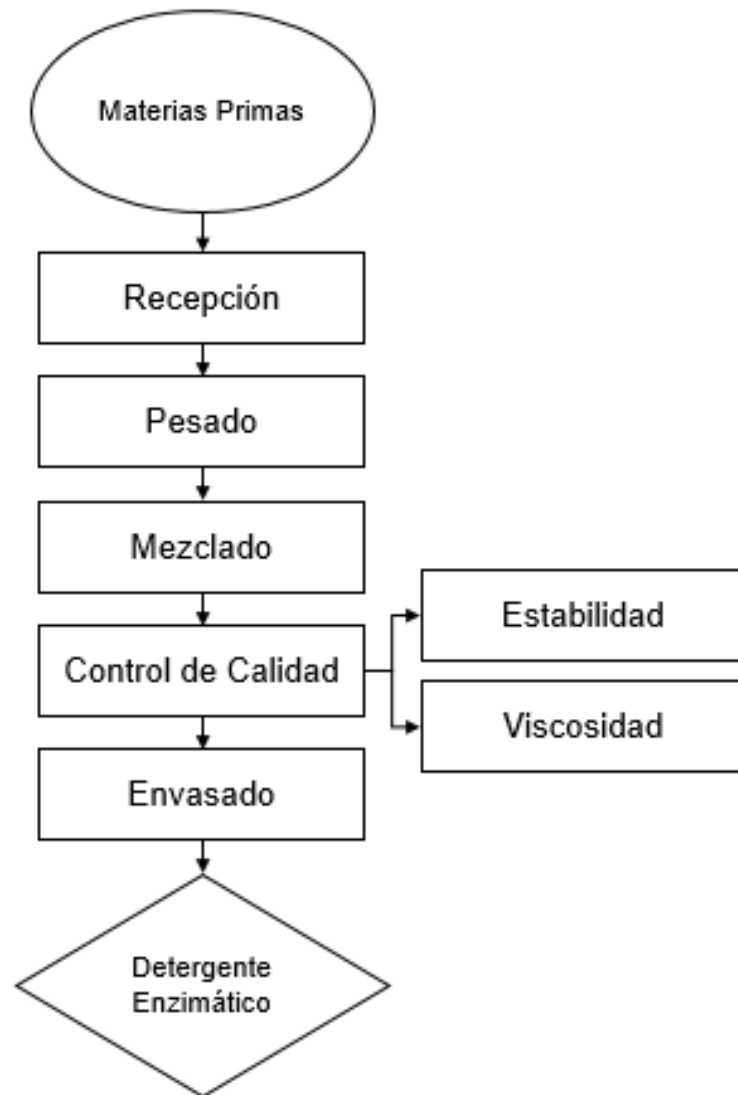
Tabla 25. Orden de la incorporación de los componentes y el tiempo de agitación.

Orden	Componente	Tiempo de Agitación
1	Agua	-
2	Hidrótopo	10 min
3	SA 10	25 min
4	SX 05	15 min
5	SA 20	15 min
6	Solución Enzimática	10 min

Como se muestra en la tabla 25, los tiempos de agitación para cada componente hacen que la preparación del detergente tenga una duración de 75 minutos aproximadamente.

4.2.3 Control de calidad. Una vez finalizado el proceso de mezclado, la preparación resultante se somete a un periodo de reposo, donde se determina la estabilidad de la emulsión formada y se corrobora que su aspecto visual, se mantenga como un líquido traslucido de coloración amarillosa. Posteriormente, se determina el perfil reológico del detergente, para establecer el tipo de fluido resultante y su viscosidad.

Figura 12. Diagrama de bloques del proceso de producción del detergente.



5. ESTIMACIÓN DE COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL DETERGENTE A NIVEL DE LABORATORIO

Para poder estimar los costos de producción del detergente líquido enzimático, es necesario establecer, en primera instancia, los costos de las materias primas que hacen parte de la formulación detergente resultante de este caso de estudio, teniendo en cuenta las presentaciones comerciales de las materias primas y la cantidad de detergente a preparar, que para efectos del cálculo, se presentan las cantidades requeridas para producir 1 litro de detergente. En la tabla 26, se muestran estos costos mencionados.

Tabla 26. Costos de materias primas en función de las cantidades requeridas por el detergente.

Insumo	Presentación	Costo (COP)	Cantidad Requerida		Costo Total (COP)
			Valor	Unidad	
Agua	Metros Cúbicos (m ³)	\$ 3.056	562,60	gramos (g)	\$ 1,72
Surfactante SA 10	Kilogramo (kg)	\$ 17.408	168,85	gramos (g)	\$ 2.939,33
Surfactante SA 20	Kilogramo (kg)	\$ 10.445	96,96	gramos (g)	\$ 1.012,74
Surfactante SX 05	Kilogramo (kg)	\$ 6.800	52,53	gramos (g)	\$ 357,17
Dietilenglicol	Kilogramo (kg)	\$ 4.500	88,87	gramos (g)	\$ 399,90
Enzima Proteasa	Litro (l)	\$ 90.000	20,00	mililitros (ml)	\$ 1.800,00
Cloruro de Calcio	Kilogramo (kg)	\$ 2.200	8,00	gramos (g)	\$ 17,60
\$ 134.409					\$ 6.528,47

Como se muestra en la tabla 26, el costo total de la compra de las materias primas en las cantidades mínimas de presentación comercial tiene un valor de \$ 134.409 COP. En lo concerniente al costo de estas materias primas, de acuerdo a las cantidades que se requieren para la preparación del detergente enzimático, este valor corresponde a \$ 6.528,47 COP. Es importante mencionar que el surfactante aniónico SA 10 y el surfactante aniónico SA 20, en presentación de 1 Kilogramo tiene un costo en dólares de US\$ 5,5 y US\$ 3,3 respectivamente, razón por la que se realiza la conversión de la moneda usando una tasa representativa del mercado (TRM) de \$ 3.165,09 COP vigente al 30 de noviembre de 2016, valores correspondientes a los mostrados en la tabla 26.

El siguiente costo implicado en la fabricación del detergente, es el costo energético, el cual es generado por los equipos requeridos en la fabricación del detergente y las pruebas control sobre los mismos, razón por la cual, en la tabla 27, se presentan los consumos energéticos de los equipos.

Tabla 27. Costos energéticos para la producción del detergente.

Equipo	Consumo (W)	Horas de Uso en el Día	Energía Consumida (kWh/Día)	Valor kWh (\$/kWh)	Costo/Día (COP)
Agitador IKA RW 20	72	1,4	0,1008	444,45	\$ 44,80
Viscosímetro Brookfield DB-E	20	1	0,02	444,45	\$ 8,89
					\$ 53,69

Finalmente, para lograr el estimado del costo de producción del detergente enzimático a nivel de laboratorio, se suman los anteriores valores calculados y se determina que producir 1 litro de detergente tiene un costo de \$ 6.582,16 COP. Es importante aclarar que además de los costos presentados, existen otros asociados a la producción del detergente que no se tuvieron en cuenta, puesto que están relacionados con factores que no se encuentran vinculados necesariamente a este trabajo o dependen de la operación regular de la empresa Saint Germain LTDA.

6. CONCLUSIONES

- Se determinaron los componentes e intervalos de composición de la formulación detergente enzimática, mediante el uso combinado de teoría y experimentación.
- Se determinó mediante experimentación, que la enzima proteasa de pH neutro-alkalino es la enzima que presenta mejores resultados en la remoción de sangre logrando mayor estabilidad al momento de potenciar la función detergente de la matriz de sustancias activas, logrando un porcentaje de remoción del 98% a una concentración del 2%.
- Los costos determinados para la producción el detergente enzimático a nivel de laboratorio son de \$ 6.582,16 COP por litro.
- El aumento en el número de grupos de óxido de etileno en la cadena etoxilada de un surfactante no iónico, contribuye a la disminución de la adsorción del surfactante sobre el textil, reduciendo su propiedad detergente.
- Para lograr que la matriz de sustancias activas presente resultados eficientes en la remoción, la composición de los surfactantes aniónicos y no iónicos debe ser de 80% y 20% respectivamente.
- La presencia del Dietilenglicol en la formulación como sustancia de característica de estabilizante, es sustancial para mantener la estabilidad del producto a mediano plazo.
- La estabilidad y actividad de la enzima se incrementa con el aumento de la concentración de iones de calcio en la formulación detergente y en el agua de lavado.
- La formulación detergente enzimática que se obtuvo en el presente estudio obtuvo resultados significativos y equiparables a los detergentes de actual uso institucional y doméstico.

7. RECOMENDACIONES

Para futuros desarrollos investigativos, desde este trabajo se recomienda:

- Realizar una prueba de biodegradabilidad al detergente, para estimar el tiempo de degradación en el ambiente.
- Realizar un análisis cuantitativo de la actividad enzimática del detergente.
- Realizar pruebas con la incorporación a la formulación de otras sustancias de carácter hidrotópico, para establecer la influencia de esta sustancia en la eficiencia del detergente.
- Como la formulación detergente buscó tener los componentes mínimos para su funcionamiento, se recomienda el ajuste de la formulación con la adición de otras sustancias para que además, el detergente tenga propiedades biocidas y así pueda llegar a tener una función más completa a nivel hospitalario.
- Evaluar la formulación con la incorporación adicional de otros tipos de enzima.
- Diseñar y escalar el proceso de producción del detergente enzimático.

BIBLIOGRAFÍA

ALFARO Yohana. Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de desulfotalea psychrophila. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense De Madrid. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 2012.

ALMAJER Deisi. Formulaciones Detergentes Biodegradables. Tesis Doctoral. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2004.

ANDERSON Virgil L. y MCLEAN, Robert A. Design of Experiments: A Realistic Approach. Vol. 5. Marcel Dekker Inc. 1974.

ANTÓN, Raquel. Cuaderno FIRP S716-A. Mezclas de Surfactantes. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 2. 1993.

BOCHO-JANISZEWSKA Anita. Effect of selected enzymes on performance of liquid laundry detergents. University of Technology and Humanities in Radom, Faculty of Materials Science and Design, Department of Chemistry. Radom, Poland.

CASALLAS Nicolás e IBAÑEZ, Kelly. Diseño de un sistema a nivel piloto para la remoción de detergentes aniónicos de una solución preparada con características de una lavandería tipo con el fin de reducir la concentración letal media (cl50-48) para daphnia pulex. Trabajo de grado Ingeniero ambiental y sanitario. Bogotá. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. 2008.

COMPOSICIÓN ESTABILIZANTE DE ENZIMAS Y SU UTILIZACIÓN EN COMPOSICIONES DETERGENTES MEJORADAS QUE CONTIENEN ENZIMAS ESTABILIZADAS. Inventor HOAI – CHAU CAO. Fecha de solicitud: 16, octubre, 1991. New York, patente de investigación 0451924, 1, Julio, 1999.

FERNANDEZ Álvaro, SALAGER Jean-Louis y SCORZZA César. Cuadernos FIRP 303-PP Surfactantes No iónicos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004.

GRIFFIN William C. Classification of surface-active agent by “HLB”. Journal Society Cosmetic Chemists. Vol. 1.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El Instituto, 2008, p.1

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El Instituto, 2008, p.1-2

_____. Referencias documentales para Fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá: El Instituto, 1998, p.2

MOGGRIDGE G. y CUSSLER E. Chemical Product Design. Cambridge Series in Chemical Engineering. UK. University Press. 2001.

MUNAR Jessica. Producción de un desengrasante enzimático de uso industrial en Produquim Ltda. Trabajo para optar por el título de Ingeniera Química. Bogotá. Universidad de América. Facultad de Ingeniería. 2013.

ORTEGA Mario. Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. Tesis Doctoral en ingeniería química. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química. 2009.

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS, LIQUIDOS, ESTABILIZADOS. Inventor HENKEL Y CIE GMBH. Alemania, patente de Invención 4003, 2, Octubre. 1973.

ROJAS Orlando. Cuaderno FIRP S520-B. Introducción a la Reología. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 2. 1999.

ROJAS Orlando, BRICEÑO María y AVENDAÑO Jorge. Cuaderno FIRP S521-C. Fundamentos de Reología. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 3. 2012.

SALAGER Jean-Louis. Cuaderno FIRP S210-A Formulación: HLB, PIT, R de Winsor. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 2. 1988.

SALAGER Jean-Louis. Cuadernos FIRP S300-A Surfactantes: Tipos y Usos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 2. 2002.

SALAGER Jean-Louis. Cuaderno FIRP S311-A. El Mundo de los Surfactantes. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 1. 1982.

SALAGER Jean-Louis. Cuaderno FIRP S331-A. Detergencia: Fenómenos y Mecanismos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 1. 1988.

SALAGER Jean-Louis. Cuaderno FIRP S332-A. Detergentes: Componentes, fabricación, fórmulas. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. Versión 1. 1988.

SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP S301-PP Surfactantes: Generalidades, Materias Primas. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004.

SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP 302-PP Surfactantes Aniónicos. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004.

SALAGER Jean-Louis y FERNANDEZ Álvaro. Cuadernos FIRP 304-PP Surfactantes Catiónicos, Otros Surfactantes. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 2004

SILVA, Madeleine. Uso de aceites esenciales en el diseño y formulación de un detergente líquido. Tesis de grado. Loja, Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica. Departamento de Bioquímica Farmacéutica. 2015

ZAMBRANO Joel. Ingeniería básica de una planta comercial de detergente líquido. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Sartenejas, Venezuela. Universidad Simón Bolívar. Coordinación de Ingeniería Química. 2010.

ZARAGOZA Julián. Aislamiento de cepas de Bacillus productoras de proteasas con potencial uso industrial. Trabajo de Maestría en Ciencias con orientación a Microbiología Industrial. Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. 2011.

ANEXOS

ANEXO A
EQUIPOS DE LABORATORIO

Figura 13. Balanza Analítica.



Figura 14. Agitador con propela de superflujo.



Figura 15. Viscosímetro con eje #3.



Figura 16. Microscopio.



Figura 17. Espectrofotómetro.



ANEXO B ELABORACIÓN DE FORMULACIONES

Adición de Agua



Adición del Hidrótopo



Adición del Surfactante SA 10



Adición del Surfactante SX 05



Adición del Surfactante SA 20



Adición de la Solución Enzimática



ANEXO C
FORMULACIONES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Tabla 28. Ensayos propuestos por el método de vértices extremos.

Ensayo	Agua (%)	Hidrótopo (%)	SA 10 (%)	SA 20 (%)	SX 05 (%)
1	52,38	9,70	19,40	14,55	0,97
2	48,50	4,85	14,55	14,55	14,55
3	58,20	0,97	14,55	8,73	14,55
4	51,41	3,57	17,73	12,14	12,14
5	51,41	7,93	15,79	9,72	12,14
6	56,26	3,57	18,22	6,81	12,14
7	58,20	0,97	14,55	14,55	8,73
8	51,41	3,57	18,22	12,14	11,66
9	56,26	7,93	15,79	11,66	5,35
10	58,20	8,73	14,55	14,55	0,97
11	53,35	3,57	15,79	12,14	12,14
12	56,26	7,93	18,22	5,35	9,23
13	57,23	9,70	14,55	14,55	0,97
14	56,26	5,02	18,22	12,14	5,35
15	51,41	7,93	15,79	12,14	9,72
16	52,38	0,97	14,55	14,55	14,55
17	51,41	7,93	18,22	12,14	7,29
18	56,26	7,93	15,79	5,35	11,66
19	56,26	7,45	15,79	12,14	5,35
20	48,50	9,70	19,40	14,55	4,85
21	56,26	3,57	15,79	9,23	12,14
22	48,50	0,97	19,40	14,55	13,58
23	51,41	3,57	18,22	11,66	12,14
24	55,78	7,93	15,79	12,14	5,35
25	48,50	0,97	19,40	13,58	14,55
26	58,20	0,97	19,40	14,55	3,88
27	56,26	7,45	15,79	5,35	12,14
28	51,41	7,93	18,22	7,29	12,14
29	58,20	3,88	19,40	14,55	0,97
30	48,50	9,70	14,55	14,55	9,70
31	58,20	0,97	19,40	3,88	14,55
32	48,50	9,70	14,55	9,70	14,55
33	48,50	0,97	18,43	14,55	14,55

Tabla 28. (Continuación).

Ensayo	Agua (%)	Hidrótopo (%)	SA 10 (%)	SA 20 (%)	SX 05 (%)
34	58,20	9,70	14,55	13,58	0,97
35	53,35	7,93	18,22	5,35	12,14
36	58,20	9,70	19,40	8,73	0,97
37	56,26	3,57	18,22	12,14	6,81
38	58,20	3,88	19,40	0,97	14,55
39	56,26	7,93	18,22	9,23	5,35
40	58,20	8,73	14,55	0,97	14,55
41	56,26	3,57	15,79	12,14	9,23
42	48,50	9,70	19,40	4,85	14,55
43	52,38	9,70	19,40	0,97	14,55
44	58,20	9,70	14,55	0,97	13,58
45	56,26	5,02	18,22	5,35	12,14
46	58,20	9,70	19,40	0,97	8,73
47	53,35	7,93	18,22	12,14	5,35
48	51,41	5,51	15,79	12,14	12,14
49	57,23	9,70	14,55	0,97	14,55
50	55,78	7,93	15,79	5,35	12,14
51	54,32	6,17	17,03	9,74	9,74

ANEXO D
FORMULACIONES EXPERIMENTALES

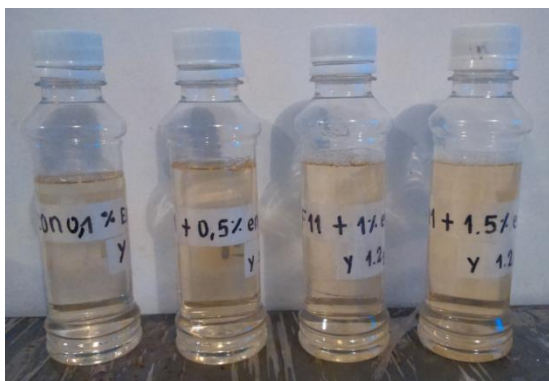
Figura 18. Formulaciones experimentales 1, 2, 3, 4 y 5.



Figura 19. Formulaciones experimentales 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.



Figura 20. Formulaciones Detergentes con diferentes concentraciones de enzima.



ANEXO E REALIZACIÓN PRUEBAS DE LAVADO

Preparación de Muestras



Incorporación de muestra en solución detergente



Lavado de la muestra a 300 RPM



Extracción de muestra y cambio de agua



Enjuagado de la muestra a 300 RPM



Muestra lavada lista para secado



ANEXO F FICHA TÉCNICA ENZIMA NEUTRO-ALCALINA

Purafect® Prime L

Proteasa Neutra-Alcalina para Detergentes

Información de Producto

■ DESCRIPCIÓN

Purafect® Prime L es una enzima proteolítica bacteriana para uso en la formulación de detergentes y caracterizada por su habilidad de hidrolizar o degradar proteínas. La enzima Purafect® Prime L es una endopeptidasa derivada del *Bacillus amyloliquefaciens* y producida mediante una cepa de *Bacillus subtilis* modificada genéticamente. Este producto es una enzima especialmente formulada para un desempeño óptimo en el rango de pH neutro a ligeramente alcalino para hidrolizar una amplia variedad de sustratos de proteína. Purafect® Prime L es gentil a las fibras basadas en proteína tales como seda y lana e hidroliza péptidos insolubles y amino ácidos, los cuales pueden ser removidos de las prendas.

■ CARACTERÍSTICAS TÍPICAS:

Actividad: 4000 PPU/g (promedio)
Apariencia: Líquido Ambar
pH: 5.5 - 6.5
Gravedad Específica: 1.05 - 1.10

Definición de Unidad

Unidades Purafect® Prime (PPU) son las unidades de actividad que miden la velocidad de proteólisis de un sustrato sintético y es determinado espectrofotométricamente contra un estándar interno.

Dependencia de la temperatura

La actividad de la endopeptidasa es efectiva en el rango de temperatura de 25°C (77°F) a 60°C (140°F), con un desempeño óptimo a 50°C (122°F). La temperatura exacta dependerá de las variables de proceso, tales como pH, tiempo, naturaleza del sustrato y concentración.

Dependencia del pH

El rango de pH para la actividad del Purafect® Prime L es de aproximadamente 6.5 a 10.5, con un pH óptimo de 8.0. El pH exacto dependerá de las variables de proceso, que incluye temperatura de lavado, tiempo, naturaleza del sustrato y concentración.

■ PARAMETEROS BIOQUÍMICOS

Tipo de Enzyme: Bacteria/serine endopeptidasa
IUB #: 3.4.21.62
CAS #: 9014-01-1
Peso Molecular: 28 kDa
IEP: 9.4
Actividades Laterales: Limitada

■ PERFIL DE ACTIVIDAD

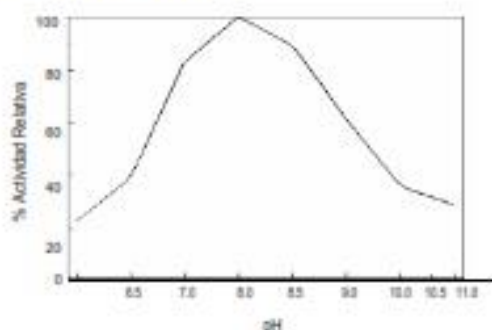


Figure 1: Perfil de actividad respecto al pH de la enzima Purafect® Prime L. Velocidades de Actividad Relativa en sustrato sintético a 25°C (77°F)

■ GUIA DE USO

Pruebas en Genencor muestran resultados óptimos para el Purafect® Prime L entre 0.5 - 1.0% p/p en detergente. Para mejores resultados en su detergente líquido, recomendamos la optimización de la dosis en la práctica.

■ ESTATUS REGULATORIO

La proteasa Purafect® Prime L es una sustancia con el número de registro Chemical Abstract Services (CAS) 9014-01-01. Está enlistada en la Toxic Substances Control Act (TSCA) Inventory y la European Inventory Substances (EINECS).

■ EMBALAJE

La proteasa Purafect® Prime L está disponible en empaques de 25 kg (55 lbs.), tambores de polietileno de 220 kg (485 lbs.) y totes de 1,100 kg.

■ ALMACENAMIENTO

La Purafect® Prime L puede ser almacenada en sus contenedores cerrados y sellados. Para asegurar máxima retención de actividad, almacene el producto en un lugar seco y frío, con el contenedor cerrado. Los contenedores de enzima deben ser almacenados a temperaturas menores a 20°C (65°F), preferentemente refrigerados y protegidos contra la luz del sol.

Durante el almacenamiento, la Purafect® Prime L tendrá una pérdida de actividad de menos de 10% en 6 meses a una temperatura de 25°C (77°F), o menos de 15% en 6 meses a una temperatura de 37°C (98.6°F). Para mayor información en el almacenaje de este producto, por favor contactar a su representante de Genencor International®.

■ SEGURIDAD Y MANEJO DE ENZIMA

Para información detallada de manejo, por favor refiérase a la Hoja de Seguridad del Material, la Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely With Enzymes*, y la Association of Manufacturers of Fermentation Enzyme Products (Amfep) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*. Todas disponibles en Genencor International®.

Para mayor información:

USA and Canada

Genencor International, Inc.

200 Meridian Centre Blvd., Rochester, NY 14618 USA

Telephone: 1-800-847-3311 (USA)

Telephone: +1-585-256-5200

Telefax: +1-585-244-4544

Europe, Africa and Middle East

Genencor International B.V.

P.O. Box 210, 2300 AE Leiden, The Netherlands

Telephone: +31-71-5666-160

Telefax: +31-71-5666-169

Latin America

Genencor International Argentina S.R.L.

Alicia Moreau de Justo 1750 Piso 2, G y H

Buenos Aires C1107AFJ

Argentina

Telephone: +54-11-5199-9350

Telefax: +54-11-5199-9359

Asia Pacific

Genencor International Asia Pacific PTE, LTD.

81 Science Park Road

The Galen #06-16 East Wing

Singapore Science Park III

Singapore 117325

Telephone: +65-6511-5600

Telefax: +65-6511-5666

Web Address

www.genencor.com

© Genencor International, Inc., 2005. PURAFECT, GENENCOR, GENENCOR INTERNATIONAL, e INNOVATIVE BY NATURE son marcas registradas de Genencor International, Inc. o sus empresas afiliadas.

La información contenida en esta literatura es basada en nuestro conocimiento, veracidad y precisión y el producto es vendido de acuerdo a las especificaciones indicadas aquí y determinadas mediante el método de ensayo descrito. Debido a condiciones de uso, errores técnicos u omisiones, manejo impropio o almacenamiento más allá de nuestro control, Genencor International se deslinda de toda responsabilidad y garantía. Genencor International no es responsable por ningún incidente, o daños especiales que resulten de alguna forma del desempeño o uso de la literatura de este producto, o del producto descrito aquí.

Nada de lo descrito aquí que sea vendido o usado debe violar regulaciones o infringir patentes u otros derechos de propiedad, derechos de licencia y las recomendaciones y usos descritos no constituyen o inducen a infringir tales derechos.

REV0105 2201 PPRIMEL 01

Printed on recycled paper

ANEXO G FICHA TÉCNICA ENZIMA ALCALINA



INTRODUCTION

EFFECTENZ™ P 100 protease is a liquid alkaline protease enzyme for use in the formulation of detergent products. EFFECTENZ™ P 100 protease hydrolyzes insoluble protein stains into soluble peptides and amino acids which then can be removed easily from fabric. It is useful in the removal of common household stains such as blood, grass, milk, gravy, etc.

EFFECTENZ™ P 100 protease is a high-efficiency, fully biodegradable enzyme derived from a genetically modified *Bacillus subtilis* strain. The protease works in conjunction with surfactants, builders, and other laundry chemicals to enhance the removal of most stains from all types of cloth surfaces under a variety of conditions.

ENZYME PROPERTIES

EFFECTENZ™ P 100 protease is active over a broad range of pH values from 6 – 12, as shown in Figure 1. Enzyme activities are normalized to pH 10 where activity is 100% at 25°C. Enzyme activities at temperatures from 25°-65°C at a pH of 8.6 are depicted in Figure 2. All activities are normalized to 100% activity at 40°C. When diluted, EFFECTENZ™ P 100 protease is stable at 25°C for 24 hours over a broad range of pH values from 4 -12, as shown in Figure 3. Thermal stability of diluted EFFECTENZ™ P 100 protease after a 10 minute incubation in a buffer solution at pH 10 is depicted in Figure 4.

UNITS OF ACTIVITY

The enzyme activity of EFFECTENZ™ P 100 protease is expressed in Genencor Subtilisin Units (GSU) per liter. Enzyme activity is determined spectrophotometrically against an internal standard using a peptide substrate. The minimum activity is 42,000 GSU per liter. The assay method is available upon request.

TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity: 42,000 GSU/liter minimum

Appearance: Brown liquid

Specific Gravity: 1.0 – 1.1

pH: 6.0 (± 0.5)

EFFECTENZ™ P 100 protease contains no other significant enzyme activities or proteins.

USAGE IN DETERGENT FORMULATIONS

The recommended use level of EFFECTENZ™ P 100 protease is typically 0.2 – 0.5% (v/v) of the liquor detergent formula. Determination of the exact amount of EFFECTENZ™ P 100 protease required for laundry applications should be based upon wash conditions, detergent formulae, amount of detergent used per wash, and the level of cleaning performance desired.

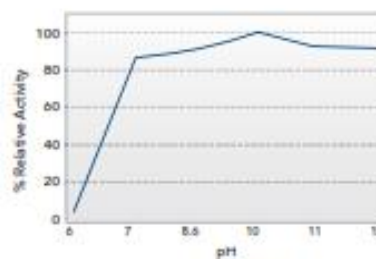


Figure 1:
EFFECTENZ™ P 100 Enzyme pH Activity Profile
Assay temperature: 25°C

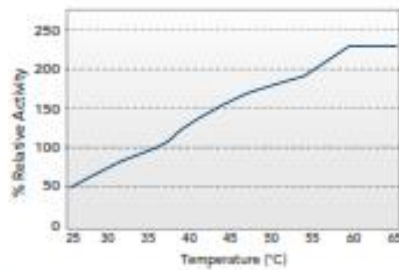


Figure 2:
EFFECTENZ™ P 100 Enzyme Temperature Activity Profile
Assay pH: 8.6

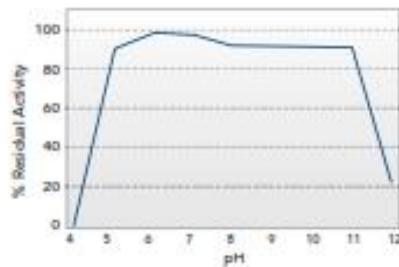


Figure 3:
EFFECTENZ™ P 100 Enzyme pH Stability Profile
4 hours at 25°C

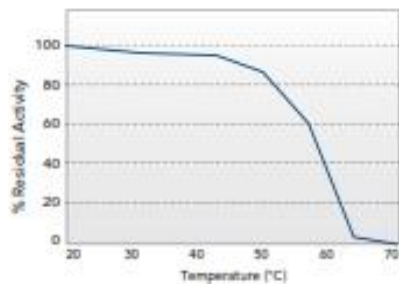


Figure 4:
EFFECTENZ™ P 100 Enzyme Temperature Stability Profile
10 minutes at pH 10.0

PACKAGING

EFFECTENZ™ P 100 protease is available in bulk and in 25 kg pails, 220 kg drums and 1100 kg totes.

STORAGE & STABILITY

EFFECTENZ™ P 100 protease is formulated for long-term storage.

REGULATORY STATUS

EFFECTENZ™ P 100 is a subtilisin enzyme preparation. Subtilisin has CAS registry number 9014-01-1. Subtilisin and the other ingredients of the product are compliant with TSCA, EINECS, DSL, ACOIN, REACH, and other regulatory inventories.

SAFETY & ENZYME HANDLING

Aerosolization and inhalation of mists from EFFECTENZ™ P 100 protease should be avoided. In case of accidental spillage or contact with the skin or eyes, promptly rinse with water for at least 15 minutes.

For detailed handling information, please refer to the appropriate Material Safety Data Sheet, the Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely With Enzymes*, and the Association of Manufacturers of Fermentation Enzyme Products (Amfep) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*, and the Soap and Detergent Association (SDA) handbook *Work Practices for Handling Enzymes in the Detergent Industry*.

For more information, speak to a member of the Fabric & Household Care team at DuPont Industrial Biosciences.

Website: fhc.biosciences.dupont.com
Email: fabricandhouseholdcare@dupont.com

Copyright © 2013 DuPont. All rights reserved. The DuPont Oval Logo, "Innovative. Everywhere." and the Load Effect are trademarks or registered trademarks of E. I. du Pont de Nemours and Company or its affiliates.

The use and sale of this product may be controlled by one or more patents in the U.S. and other countries as well as pending patents in the U.S. and other countries.


The information provided herein is based on data DuPont believes to be reliable, to the best of its knowledge, applies only to the specific material designated herein as sold by DuPont and does not apply to use of the material in any process or in combination with any other material. It is provided at the request of and without charge to our customers. Accordingly, DuPont cannot guarantee or warrant such information and assumes no liability for its use. Other than as set forth in a contract of sale, DuPont makes no warranty, express or implied, as to the material or finish herein, including the accuracy of merchandise labels or fitness for a particular use.

In case this product literature is a translated version of the original and internally approved English version, DuPont hereby disclaims responsibility for any editorial changes and errors caused by the translation, and shall not be liable for any losses caused by reliance on the accuracy and reliability of translated information. The original and internally approved English version is and shall remain the controlling version of this document.

This document is subject to change without further notice.

REV 01 20FEB2013 EFF P 100



 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016


AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES




Nosotros **Joan Sebastián García Acevedo** y **Luisa Fernanda Montoya Niño** en calidad de titulares de la obra **Evaluación de la incorporación de enzimas proteasas en un detergente líquido para la remoción de manchas de sangre, aplicando la metodología de diseño de productos químicos**, elaborada en el año **2016**, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma, como autores, autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

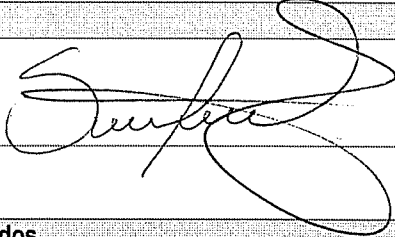
AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Para constancia se firma el presente documento en (la ciudad), a los 13 días del mes de marzo del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Joan Sebastian	Garcia Acevedo
Documento de identificación No	Firma
C.C. 1.014.240.495	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Luisa Fernanda	Montoya Niño
Documento de identificación No	Firma
C.C. 1.019.039.874	Luisa Montoya.