

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Química

**ESTUDIO DE FORMULACIONES DETERGENTES Y
MÉTODOS PARA LA LIMPIEZA DEL ALMIDÓN EN
LA INDUSTRIA ALIMENTARIA UTILIZANDO
MICRO/NANOPARTÍCULAS, ENZIMAS Y
TENSIOACTIVOS**

Otilia Herrera Márquez

2016

Directores:

Dr. José María Vicaria Rivillas

Dra. Encarnación Jurado Alameda

Autor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Otilia Herrera Márquez
ISBN: 978-84-9163-035-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44295>

**ESTUDIO DE FORMULACIONES DETERGENTES Y
MÉTODOS PARA LA LIMPIEZA DEL ALMIDÓN EN
LA INDUSTRIA ALIMENTARIA UTILIZANDO
MICRO/NANOPARTÍCULAS, ENZIMAS Y
TENSIOACTIVOS**

Otilia Herrera Márquez

Memoria presentada para la obtención del Grado de Doctor por la
Universidad de Granada

Granada, noviembre de 2016

Directores:

Dr. José María Vicaria Rivillas

Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química

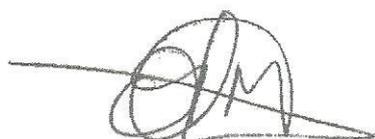
Dra. Encarnación Jurado Alameda

Catedrática del Departamento de Ingeniería Química

La doctoranda OTILIA HERRERA MÁRQUEZ y los directores de la Tesis JOSÉ MARÍA VICARIA RIVILLAS y ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

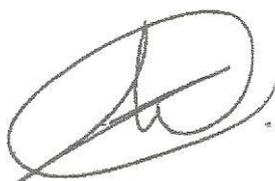
Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Granada, a 21 de noviembre de 2016

La doctoranda:



Fdo.: Otilia Herrera Márquez

Los directores de la Tesis:



Fdo.: José María Vicaria Rivillas
Profesor Titular del Departamento
de Ingeniería Química

Fdo.: Encarnación Jurado Alameda
Catedrática del Departamento
de Ingeniería Química

A mi madre

Agradecimientos

Este trabajo es fruto de la investigación realizada en los últimos años en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada. Sin duda tengo mucho que agradecer a tantas personas que han contribuido a que esta experiencia haya sido tremendamente enriquecedora para mí, tanto en lo profesional como en lo personal.

Por supuesto a mis directores de Tesis, al Dr. José María Vicaria Rivillas y a la Dra. Encarnación Jurado Alameda por su entrega y dedicación y, sobre todo, por su confianza en mí y en mi trabajo.

A todos los profesores del Departamento de Ingeniería Química por su amabilidad y disponibilidad. Y a tantos compañeros (de prácticas, becarios, estancias breves, doctores) que han compartido su tiempo conmigo en el laboratorio de Tensioactivos, Enzimas y Emulsiones, con los que he pasado tan buenos momentos y de los que he aprendido tanto.

A mis amigos, especialmente a mis amigas doctoras. Con ellos he compartido tantas cosas, también este proceso, y siempre he tenido su apoyo y su ánimo.

Y por último, a toda mi familia y a mi pareja, por creer en mí y apoyarme siempre para que pueda alcanzar mis objetivos.

Índice

Resumen	17
Summary.....	25
Objetivos	33
Objectives.....	39
Capítulo 1. Introducción	45
1.1 Almidón. Características como agente de suciedad en la industria alimentaria	47
1.1.1 Comportamiento del almidón en el proceso de lavado	51
1.2 Detergencia	54
1.2.1 Mojado.....	54
1.2.2 Desplazamiento de la suciedad	55
1.2.3 Separación de la suciedad de la superficie limpia.....	57
1.3 Métodos de limpieza en la industria alimentaria.....	58
1.3.1 Sistemas de limpieza CIP	59
1.3.2 Factores que determinan la eficacia de las operaciones de limpieza ..	63
1.3.2.1 Características de la suciedad.....	63
1.3.2.2 Superficies a limpiar	67
1.3.2.3 Tiempo de lavado.....	70
1.3.2.4 Acción mecánica y fuerzas hidrodinámicas	71
1.3.2.5 Temperatura.....	72
1.4 Formulaciones detergentes.....	74
1.4.1 Composición.....	74
1.4.2 Uso de los tensioactivos en detergentes	78

1.4.2.1 Aniónicos.....	80
1.4.2.2 No iónicos.....	82
1.4.2.3 Catiónicos.....	86
1.4.2.4 Anfotéricos.....	87
1.4.3 Uso de enzimas en formulaciones detergentes.....	88
1.4.3.1 α -amilasas.....	89
1.4.4 Micropartículas y nanopartículas en detergentes.....	92
1.5 Limpieza de superficies duras mediante electrólisis.....	96
1.5.1 Limpieza electroquímica de metales.....	96
1.5.2 Agua electrolizada. Aplicación a la limpieza y desinfección en la industria alimentaria.....	98
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	103
2.1 Sustrato.....	105
2.2 Suciedad.....	105
2.3 Tensioactivos.....	105
2.4 Enzima.....	107
2.5 Métodos de análisis.....	107
2.5.1 Análisis de tensioactivos.....	107
2.5.1.1 Determinación de alcohol etoxilado (AE) mediante el método colorimétrico del yodo-yoduro.....	107
2.5.1.2 Determinación de alquilpoliglucósidos (APG) mediante el método de la antrona.....	109
2.5.2 Determinación de almidón mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico.....	110
2.5.3 Determinación de la actividad de la enzima α -amilasa mediante el método yodométrico.....	112
2.5.4 Determinación de la actividad enzimática en presencia de tensioactivos mediante el método DNS.....	114
2.5.4.1 Cálculo de la actividad enzimática y de la actividad relativa.....	119
2.6 Método de ensuciamiento de sustrato con almidón.....	119

2.7 Descripción del dispositivo BSF y del procedimiento de lavado	122
2.8 Estudio de la influencia del uso de micropartículas y nanopartículas sobre los tensioactivos y el proceso de lavado .	125
2.8.1 Micropartículas y nanopartículas utilizadas	125
2.8.2 Disoluciones utilizadas	127
2.8.3 Preparación de soluciones de tensioactivos con micro/nanopartículas en suspensión	127
2.8.4 Interacción entre tensioactivos no iónicos y micro/nanopartículas en soluciones acuosas	128
2.8.5 Influencia de las partículas en la determinación del almidón	128
2.8.6 Diseño de experimentos para la modelización de la detergencia en soluciones de lavado que contienen partículas y tensioactivos no iónicos	130
2.9 Procedimiento de limpieza de superficies metálicas mediante aplicación de corriente continua (electrocleaning)	133
Capítulo 3. Resultados	139
3.1 Estudio del comportamiento de formulaciones detergentes que contienen partículas en el lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable	141
3.1.1 Estudio de interacción entre soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos y partículas	141
3.1.2 Estudio de la eficacia de lavado del almidón seco con formulaciones detergentes que contienen partículas	144
3.1.2.1 Cálculo de la detergencia a partir de los ensayos de lavado	145
3.1.2.2 Diseño de experimentos para modelización de la detergencia	149
3.1.2.3 Influencia de la concentración de partículas sobre la detergencia en suspensiones de pH 13 con y sin tensioactivos no iónicos	153
3.2 Estudio del comportamiento de formulaciones detergentes que contienen α-amilasa en el lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable	156
3.2.1 Actividad de la enzima α -amilasa en presencia de tensioactivos	156

3.2.2 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable obtenida mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa	158
3.2.3 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable obtenida mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa y tensioactivos.....	163
3.3 Procedimiento de limpieza de almidón seco mediante aplicación de corriente continua (electrolimpieza o electrocleaning)	166
3.3.1 Análisis de la influencia de distintas variables en el proceso de lavado mediante electrolimpieza.....	166
3.3.2 Análisis de la influencia de los tensioactivos en el proceso de electrolimpieza de almidón seco	171
Capítulo 4. Discusión de resultados	173
4.1 Lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable con formulaciones detergentes que contienen partículas	175
4.1.1 Interacción entre soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos y partículas	175
4.1.2 Estudio de la eficacia de lavado del almidón seco con formulaciones detergentes que contienen partículas de sílice	179
4.1.2.1 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D1, suspensión de partículas S50 en solución a pH constante	179
4.1.2.2 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D2, suspensión de partículas S50 en solución de AE a pH constante	187
4.1.2.3 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D3, suspensión de partículas S50 en solución de APG a pH constante.....	193
4.1.2.4 Influencia de la concentración de partículas sobre la detergencia en suspensiones de pH 13 con y sin tensioactivos no iónicos	199
4.2 Comportamiento de formulaciones detergentes que contienen α-amilasa en el proceso de lavado de almidón seco	204
4.2.1 Efecto de la presencia de tensioactivos sobre la actividad enzimática	204

4.2.2	Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante de soluciones de lavado que contienen α -amilasa..	208
4.2.3	Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa y tensioactivos.....	212
4.3	Limpieza de almidón seco mediante aplicación de corriente continua.....	219
4.3.1	Análisis de la influencia de distintas variables en el proceso de lavado mediante electrolimpieza.....	220
4.3.1.1	Influencia de voltaje y polaridad	220
4.3.1.2	Influencia de la temperatura.....	223
4.3.1.3	Influencia del pH	225
4.3.1.4	Influencia del mojado previo	226
4.3.2	Análisis de la influencia de los tensioactivos en el proceso de lavado mediante electrolimpieza.....	227
Capítulo 5.	Conclusiones	231
Chapter 6.	Conclusions.....	237
Referencias bibliográficas		241
Nomenclatura		269

Resumen



Introducción y objetivos

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado el uso de distintas formulaciones detergentes y métodos de limpieza en el proceso de eliminación de almidón seco adherido a superficies duras, concretamente a acero inoxidable. El almidón es un ingrediente ampliamente utilizado en la industria alimentaria en distintas preparaciones y productos, utilizándose también como aditivo espesante, gelificante o agente de retención de agua. Las suciedades amiláceas dificultan especialmente los procesos de limpieza CIP (Clean-In-Place) en instalaciones industriales, ya que suelen adherirse a las superficies internas de tuberías y accesorios, haciendo difícil su eliminación. Por otro lado, el acero inoxidable es el material habitualmente utilizado en la fabricación de equipamiento para la industria alimentaria.

Dentro del ámbito de la hostelería y la industria alimentaria las formulaciones detergentes están evolucionando en los últimos años hacia composiciones más eficientes desde un punto de vista económico y ambiental, optimizándose su composición. Esta evolución tiene los objetivos de reducir el consumo energético del proceso de limpieza, así como aumentar la protección de las superficies y la biodegradabilidad de las aguas de lavado. Estos requisitos se han tenido en cuenta en este trabajo a la hora de llevar a cabo la formulación de las disoluciones de lavado utilizadas en la limpieza del almidón seco. Concretamente, se han estudiado formulaciones que atienden a los siguientes criterios:

- Utilización de tensioactivos respetuosos con el medio ambiente, fácilmente biodegradables y de baja toxicidad.
- Utilización de disoluciones enzimáticas, lo que permite acortar los tiempos de lavado, reduciendo el consumo de agua y energía y permitiendo el descenso de la temperatura y el pH de trabajo.
- Utilización de micro- y nanopartículas que aumenten la eficacia de lavado gracias a su influencia en los fenómenos de superficie involucrados en los procesos de limpieza y a su potencial efecto abrasivo.

También en los últimos años se han ido desarrollando nuevos métodos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria basados en la electrólisis del agua o de soluciones salinas. El agua electrolizada permite el diseño de procesos de limpieza con bajo coste económico y mínimo impacto ambiental. Estos métodos están obteniendo una alta eficacia tanto en la limpieza como en la desinfección de conducciones y equipos en la industria láctea.

En esta Tesis Doctoral se ha analizado la influencia que tiene sobre la limpieza de almidón seco la incorporación de micro- y nanopartículas así como de la enzima α -amilasa como ingredientes en las formulaciones detergentes. Se ha determinado la eficacia de dichas formulaciones mediante la realización de ensayos de lavado estandarizados. También se ha desarrollado un nuevo método de limpieza del almidón adherido a superficies metálicas mediante aplicación de corriente continua.

Materiales y métodos

Se ha evaluado la capacidad de limpieza del almidón adherido a superficies de acero inoxidable. Para ello se han ensayado siete tensioactivos diferentes, tanto aniónicos como no iónicos, de cinco familias distintas: un lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), dos ácidos alquil éter carboxílicos (ECA), un alcohol etoxilado (AE), un alquilpoliglucósido (APG) y dos ésteres de glicerina polietoxilados (PGE). Se ha analizado la concentración de AE por el método colorimétrico del yodo-yoduro, mientras que la concentración de APG se evaluó mediante el método de la antrona.

La enzima utilizada es una α -amilasa termoestable procedente de *Bacillus Licheniformis*. Se controló su actividad a lo largo del tiempo de experimentación mediante el método yodométrico. La formación de complejos entre tensioactivos y almidón hace que el método yodométrico deje de ser válido para el estudio de la actividad de la α -amilasa en presencia de tensioactivos, por lo que se ha utilizado también el método DNS para determinar la estabilidad de la enzima en el seno de formulaciones detergentes.

Se ha estudiado la influencia que ejerce sobre la capacidad de lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable la incorporación de cinco micro- y nanopartículas

de diferentes características y composición (sílice y magnetita). Las partículas seleccionadas son ampliamente utilizadas como aditivos en multitud de productos químicos. Se ha estudiado la estabilidad de dichas partículas en suspensiones acuosas en presencia de tensioactivos. Con el fin de conocer el comportamiento de las partículas en el seno de una solución detergente se estudió su interacción con los tensioactivos no iónicos AE y APG en solución acuosa. Para ello se prepararon suspensiones de distinta concentración de partícula en soluciones de 1 g/L de tensioactivo, procediéndose a la separación de las partículas (por centrifugación o mediante magnetismo) y a la determinación de la concentración de tensioactivo residual en el sobrenadante.

La detergencia obtenida con las formulaciones estudiadas (que incorporan tensioactivos, enzima y/o partículas) se ha evaluado en el dispositivo patentado Baño-Sustrato-Flujo (BSF) diseñado para determinar la eficacia detergente de fórmulas de lavado en superficies duras simulando un sistema CIP de limpieza industrial. Como sustrato se utilizaron esferas hechas a partir de fibras de acero inoxidable ensuciadas con gel de almidón y secadas posteriormente. El dispositivo BSF permite modificar los elementos principales que intervienen en el proceso detergente: sustrato, suciedad, composición del baño de lavado, pH, temperatura y caudal de recirculación del sistema. La detergencia en cada ensayo de lavado se obtuvo determinando la concentración de almidón en el baño de lavado a diferentes tiempos de ensayo, utilizando el método colorimétrico del fenol-sulfúrico.

Por último, se ha desarrollado y patentado un dispositivo y procedimiento para la limpieza de almidón adherido a acero inoxidable mediante electrolimpieza. El sistema se basa en la circulación de corriente continua entre dos electrodos conectados a un generador, uno de los cuales se conecta al sustrato a limpiar. El dispositivo de electrolimpieza permite estudiar la influencia que ejercen diversos factores sobre la detergencia, pudiéndose modificar la temperatura, polaridad, tiempo, composición de la solución de lavado y voltaje para optimizar las condiciones óptimas del proceso.

Resultados y discusión

Se ha estudiado la interacción que presenta en solución acuosa las partículas de sílice y magnetita con los tensioactivos AE y APG determinándose la concentración de tensioactivo en el sobrenadante de suspensiones preparadas con dichas partículas. Se ha observado que el AE se adsorbe sobre todas las partículas estudiadas. Este descenso en la concentración de tensioactivo fue significativamente mayor en las suspensiones de las micropartículas Sipernat 50 (S50), por lo que se tomaron como referencia para el posterior estudio de la detergencia mediante el uso de fórmulas de lavado que contienen partículas.

Para estudiar la eficacia de lavado del almidón seco con fórmulas detergentes que contienen las partículas S50 se llevó a cabo un diseño factorial completo 2^3 donde los factores considerados fueron la concentración de partículas, el pH y el caudal. Este diseño se aplicó a tres formulaciones de lavado diferentes: suspensión acuosa de S50 a pH constante, suspensión acuosa de S50 a pH constante con AE 1 g/L y suspensión acuosa de S50 a pH constante con APG 1 g/L. Se modelizó la detergencia a tiempo final del ensayo (45 minutos), encontrándose que en los tres diseños de experimentos la detergencia se ajusta a un modelo empírico lineal con interacción de factores y adición de un término cuadrático de pH.

De los tres factores, el pH es el factor que tiene un efecto más significativo sobre la detergencia, alcanzándose los valores máximos a $\text{pH} = 13$. El aumento de caudal también influye positivamente sobre la detergencia, aunque en menor magnitud. La concentración de partículas ejerce un efecto distinto en función del tipo de solución estudiada, no afectando a la detergencia de soluciones pH 13 sin tensioactivo y reduciéndose la detergencia de soluciones pH 13 con AE (1 g/L) al aumentar la concentración de partículas S50. La detergencia alcanzada con soluciones de pH 13 con APG aumenta cuando aumenta la concentración de partículas y el caudal también es elevado, encontrándose el óptimo de detergencia en la solución de lavado con APG (1 g/L).

Se realizaron también ensayos de actividad de la α -amilasa mediante el método DNS utilizando condiciones experimentales que reproducen las utilizadas en los

ensayos de lavado con soluciones enzimáticas en el dispositivo BSF (pH 7, 60 °C). Se ha encontrado que la enzima mantiene su actividad en presencia de todos los tensioactivos antes mencionados. Este resultado permite considerar su incorporación a estas soluciones de tensioactivos y estudiar su eficacia de lavado sobre el almidón seco.

Los ensayos de lavado realizados con soluciones que incorporan enzimas han mostrado que la detergencia depende fuertemente de la temperatura y concentración de enzima utilizadas. Las formulaciones enzimáticas permiten buenos resultados de detergencia a valores neutros de pH, si bien a temperaturas moderadas (40 °C) resulta más eficaz el lavado con soluciones alcalinas (pH 13). Aumentando la concentración de enzima se puede alcanzar una detergencia del 100% a 60°C. Sin embargo, la incorporación de partículas S50 a la formulación enzimática no demostró tener efecto sobre la detergencia.

Por otra parte, se realizaron ensayos de lavado en BSF a 40 °C y 60 °C con soluciones pH 7 con α -amilasa (0.06 g/L) y los tensioactivos estudiados (1 g/L). Ninguno de los tensioactivos utilizados mejoraba la detergencia de la solución enzimática en ausencia de tensioactivo, encontrándose que a 60 °C los tensioactivos AE y ECA-OE3 reducían el valor de detergencia a tiempo final. En el caso del tensioactivo AE se comprobó además que este efecto se acentuaba con el tiempo de lavado y con la concentración de tensioactivo.

El estudio del lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua se realizó en un dispositivo de electrolimpieza, evaluándose la influencia de diversos factores sobre la detergencia: voltaje (0-10 V), tiempo de aplicación de corriente (10-20 minutos), inversión de la polaridad, pH (1-13), periodo de mojado previo a la aplicación de corriente (10-20 minutos) y temperatura (10-60 °C). Los resultados obtenidos permitieron establecer unas condiciones óptimas de lavado considerando criterios de eficacia detergencia y de ahorro energético, encontrándose que las condiciones óptimas de lavado se alcanzan con una solución de lavado de pH 13, aplicando 5V durante 20 minutos a 20 °C.

Finalmente se estudió la influencia que ejerce en el proceso de electrolimpieza la presencia de tensioactivos en la solución de lavado (en concentración 1 g/L). Se demostró que los siete tensioactivos estudiados mejoraban la detergencia en ensayos

realizados en las condiciones óptimas de lavado descritas anteriormente. Los tensioactivos no iónicos estudiados (a excepción del APG) son los que proporcionaron una mayor detergencia, alcanzándose valores próximos al 90%.

Por último, en el Capítulo 6 se exponen las principales conclusiones generales derivadas de los distintos trabajos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral.

Summary



Introduction and objectives

In this Ph.D. Thesis the study has focused on the use of different detergent formulations and cleaning methods for the removal of dried starch adhered to hard surfaces, particularly stainless steel. Starch is a valuable ingredient in the food industry for different food preparations and products, being used for thickening, gelling, and as a water-retention agent too. Starchy soils hinder the CIP (Clean-In-Place) processes, as they are difficult to remove because of its adherence to internal surfaces in pipes and accessories. On the other hand, stainless steel is the material commonly used in the manufacture of equipment for food industry.

In recent years detergent formulations for hostelry and food industry are evolving into more efficient compositions from an economic and environmental point of view, being their compositions optimized. This evolution pursues the goals of reduction of energy consumption as well as the improvement in surfaces protection and in biodegradability of the waste water of the cleaning processes. These requirements have been considered in this work when developing the detergent formulations used for the cleaning of dried starch. Specifically, different formulations have been studied according to the following guidelines:

- Use of eco-friendly, readily biodegradable and low toxicity surfactants.
- Use of enzymatic solutions, allowing shorter cleaning times, lower water and energy consumption and low temperature and pH conditions as well.
- Use of micro- and nanoparticles, which may increase cleaning efficiency because of their influence in surface phenomena related with cleaning processes and due to their potential abrasive effect.

Also, in recent years new cleaning and disinfection methods have been developed in food industry, such as those based on water (or salt solutions) electrolysis. Electrolyzed water contributes to the design of cleaning processes with low costs and minimum environmental impact. High cleaning and disinfection efficiency is obtained with these methods in pipes and equipment in dairy industry.

In this Thesis the influence of the inclusion of micro- and nanoparticles as well as the enzyme α -amylase as ingredients in detergent formulations for cleaning dried starch has been studied. The efficiency of these formulations has been measured by means of standardized cleaning tests. Also, a new cleaning method for starch adhered to metallic surfaces using direct current has been developed.

Materials and methods

In this work the cleanability of the starch adhered to stainless steel surfaces has been assessed. To that effect seven surfactants, both anionic and non ionic, belonging to five different families have been studied: a linear alkylbenzene sulfonate (LAS), two alkyl ether carboxylic acids (ECA), an ethoxilated alcohol (AE), an alkylpolyglucoside (APG) and twopolyethoxylated glycerine esters (PGE). AE concentration was determined by the iodine-iodide colorimetric method while APG concentration was assessed by the anthrone method.

The enzyme used in this research is a thermostable α -amylase from *Bacillus Licheniformis*. Enzymatic activity was measured regularly using the iodometric method to assess the α -amylase stability during the testing period. The surfactant competes with iodine to form complexes with starch, interfering in the accuracy of iodometric method. This is the reason why the enzymatic activity in the presence of surfactants has been measured by the DNS method too.

The influence of the inclusion of five micro- and nanoparticles with different characteristics and composition (silica and magnetite) on the cleanability of dried starch adhered to stainless steel has been studied. The particles selected are widely used as additives in many different chemical products. Their stability in aqueous surfactants solutions has been studied. In order to know the role of the particles when they are part of a detergent solution, their interaction with the non ionic surfactants AE and APG in aqueous solution was studied. Suspensions with different particle concentrations in 1 g/L surfactant solutions were prepared, being the particles separated afterwards by centrifugation or a magnetic field. After that, surfactant concentration in the liquid supernatant was determined.

The detergency of the formulations studied in this work (with different surfactants, enzyme and/or particles) has been evaluated by the patented device Bath-Substrate-Flow (BSF), designed for testing the cleaning efficiency of washing formulations in hard surfaces simulating a CIP system. The substrate used was a set of spherical wads of stainless-steel fibres soiled with gelatinized corn starch and dried afterwards. The BSF device allows the modification of important variables in the detergency process: substrate, soil, washing bath composition, pH, temperature and flow rate. The detergency in each washing test was obtained measuring the starch concentration in the washing bath at different testing times using the phenol-sulfuric colorimetric method.

Finally, a device and procedure for cleaning starch adhered to stainless steel by means of electrocleaning has been developed and patented. The device is based on the flow of direct current between two electrodes connected to a DC generator, one of them being connected to the soiled substrate. The electrocleaning device has been designed for the study of the influence of different variables in the detergency, such as temperature, polarity, time, washing bath composition and voltage. Optimal operation conditions can be obtained evaluating these effects.

Results and discussion

Interaction between silica or magnetite particles and the surfactants AE and APG has been studied measuring the surfactant concentration in the liquid supernatant of aqueous suspensions prepared with these particles. It has been observed that AE surfactant adsorbs on all the particles studied, decreasing its concentration in the supernatant with respect to the initial concentration (1 g/L). This decrease was much higher in suspensions with microparticles Sipernat 50 (S50), so these particles were taken as a reference for the later detergency study with washing formulations including particles.

The cleaning study of dried starch with detergent formulations including the particles S50 was based on a complete factorial design 2^3 where the factors considered were particle concentration, pH and flow rate. This design was used with three different washing formulations: S50 aqueous suspension with constant pH,

S50 aqueous suspension with constant pH and AE 1 g/L and S50 aqueous suspension with constant pH and APG 1 g/L. A model for detergency at the end of the test (45 minutes) was obtained, finding that in all three suspensions studied detergency was fixed to an empirical lineal model with factors interaction and with addition of a quadratic pH term.

The factor with the most significant effect in detergency is pH, reaching the highest values at pH = 13. The increase of flow rate has a positive influence on detergency too, but in a lesser extent. Particle concentration has different effects depending on the type of solution studied; it doesn't affect to the detergency of pH 13 solutions without surfactant and the detergency values in pH 13 solutions with AE (1 g/L) decreases when the concentration of particles S50 increases. Finally, detergency obtained with pH 13 solutions with APG increases when particle concentration increases and flow rate is high too, finding the optimal detergency value for the solution with APG (1 g/L).

Amylase activity was measured by the DNS method reproducing the experimental conditions used in the washing tests with enzymatic solutions in BSF device (pH 7, 60 °C). It has been found that the enzymatic activity isn't altered in the presence of any of the aforementioned surfactants. This result leads to consider the inclusion of the α -amylase in these surfactant solutions and measure their washing efficiency on dried starch.

Washing tests carried out with enzymatic solutions reveal the importance of temperature and enzyme concentration on detergency. Detergency of enzymatic formulations is significant at mild pH values, although when using moderate temperatures (40 °C) alkaline solutions (pH 13) are more efficient. At 60 °C detergency of 100% can be obtained increasing enzyme concentration; nevertheless, the incorporation of particles S50 didn't have noticeable effects on detergency.

Moreover, washing tests in BSF device were carried out at 40°C and 60 °C with pH 7 solutions with α -amilase (0.06 g/L) and each one of the surfactants studied (1 g/L). Detergency didn't increase with the presence of none of the surfactants and when AE or ECA-OE3 was included in the enzymatic solution detergency at the end of the test decreased. When the surfactant AE was used it was found also that this

effect was emphasized when the washing time and surfactant concentration increased.

The study of the cleaning of dried starch adhered to stainless steel by means of direct current was made in the electrocleaning device, assessing the influence of different factors on detergency: voltage (0-10 V), time with flow of direct current (10-20 minutes), polarity inversion, pH (1-13), wettability time before the current flow (10-20 minutes) and temperature (10-60 °C). Results obtained led to the definition of optimal conditions for the cleaning process in this experimental device, according to energy saving and cleaning efficiency criterion. It has been found that these optimal conditions are reached with a cleaning solution with pH 13 and applying a 5V current during 20 minutes at 20 °C.

Eventually the influence of surfactants added to the washing solution (concentration 1 g/L) in the electrocleaning process was studied. In the optimal cleaning conditions described above the addition of all the surfactants tested increased detergency results. The highest values of detergency, reaching values near to 90%, was obtained with the non ionic surfactants (with the exception of APG).

Finally, the main conclusions from the research work done for this Ph.D. Thesis are presented in Chapter 6.

Objetivos

La industria de los detergentes y productos de limpieza tiene un elevado volumen de producción y de diversificación de productos. Sólo en España en 2015 la facturación anual de las preparaciones detergentes de base tensioactiva supuso 300 millones de euros y una producción estimada de 330.000 toneladas, lo que supuso un incremento del 42% con respecto al año 2010 (INE, 2016). Dentro del sector de los detergentes existe un subsector que fabrica productos específicos para su aplicación en la industria, colectividades, restauración y hostelería y que representa un 10% del mercado total.

Este mercado ha sufrido una transformación sustancial en los últimos años debido al crecimiento del consumo, al aumento de las exigencias medioambientales y al incremento del coste de la energía y las materias primas. Debido a estos aspectos es necesario desarrollar nuevas formulaciones de limpieza (Waldhoff y Spilker, 2005). Esto ha conllevado la reformulación de los detergentes actuales, buscando alternativas amigables con el medio ambiente y más eficaces. El uso de tensioactivos de origen natural o altamente biodegradables, la reducción en el uso de polifosfatos así como la incorporación de micro- y nanomateriales o enzimas altamente estables persiguen optimizar la limpieza cumpliendo los actuales requerimientos de precio, ahorro energético, protección de las superficies y biodegradabilidad. Por otro lado, se han venido desarrollando nuevos métodos de limpieza y desinfección que ya se aplican en la industria alimentaria basados en la electrólisis del agua, generando agua electrolizada (EW) que proporciona una alta desinfección a un bajo coste y mínimo impacto ambiental (Huang *et al.*, 2008).

Dentro de la industria alimentaria el proceso de limpieza es una operación crítica. La normativa del sector establece que los productos alimentarios han de tener unas condiciones higiénicas muy exigentes, por lo que la limpieza y desinfección debe ser realizada de forma regular. Esto requiere que los procedimientos de limpieza incorporen agentes químicos que dejen las superficies física y microbiológicamente limpias, evitando problemas de higiene y obstrucción en los equipos. Generalmente, estos procedimientos están estandarizados y son utilizados de forma similar para la limpieza de distintos tipos de superficies y suciedades. Sin embargo, la formulación de lavado debe optimizarse en función de

la suciedad que se pretende eliminar y de la superficie o material a limpiar (Suárez *et al.*, 2012). En general, la efectividad del proceso de limpieza dependerá de numerosos factores, tales como las propiedades y concentración de la suciedad, las propiedades del sustrato, las características del dispositivo de lavado, temperatura, formulación detergente, factores hidrodinámicos y duración del proceso (Wildbrett, 2000).

Uno de los ingredientes más empleados en la industria alimentaria es el almidón, siendo ampliamente utilizado como espesante, gelificante y agente de retención de agua, además de para producir una gran variedad de alimentos (Singh *et al.*, 2003). En los procesos industriales que utilizan almidón o sus derivados es frecuente que los productos se adhieran a las superficies internas de tuberías y accesorios, siendo estos residuos difíciles de eliminar. La fuerza de esta adhesión depende de la interacción entre el almidón y sustrato (Liu *et al.*, 2006a). Los fluidos que contienen almidón pueden ser clasificados como líquidos de alta viscosidad, siendo necesaria una temperatura de lavado elevada para su eliminación, en función de la concentración y estructura física del gel que se forme (Fryer y Asteriadou, 2009). Por todo esto resulta especialmente necesario desarrollar formulaciones específicas que optimicen la limpieza del almidón adherido sobre superficies duras y que a su vez reduzcan los costes totales del proceso.

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral se enmarcan dentro del proyecto de investigación de título “Formulaciones tensioactivas ecológicas y específicas para diferentes suciedades y sustratos” (CTM2010-16770, Ministerio de Economía y Competitividad, Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada) así como del Contrato nº 3128 suscrito entre Betelgeux, S.L. y la Universidad de Granada “Procesos de higiene de alto rendimiento en sistemas CIP mediante el desarrollo de nanomateriales y nuevas tecnologías químicas (CIP-NANOTEC)”. Estos proyectos se han centrado en el desarrollo de nuevas formulaciones de detergentes industriales de base líquida, específicas para diversos tipos de suciedades (grasas, proteicas y amiláceas) y enfocadas a obtener un mayor rendimiento económico y un menor impacto medioambiental. En concreto la presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de formulaciones detergentes y nuevos métodos de limpieza de almidón seco adherido sobre superficies de acero inoxidable. Para ello se han planteado como objetivos generales el estudio de la influencia que sobre la detergencia tiene la incorporación de micro- y

nanopartículas y de la enzima α -amilasa en las formulaciones detergentes, evaluándose la eficacia de dichas formulaciones mediante la realización de ensayos de lavado. También se ha desarrollado un nuevo método de limpieza del almidón adherido a superficies metálicas mediante aplicación de corriente continua, evaluándose la capacidad detergente alcanzada mediante este método. Para el cumplimiento de estos objetivos generales se plantean una serie de objetivos específicos:

- 1.** Estudio de la interacción entre soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos y partículas de sílice y magnetita.
- 2.** Determinación de la eficacia detergente de diversas formulaciones detergentes que incorporan partículas mediante ensayos de lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable, estudiando la influencia de distintos parámetros sobre el proceso de limpieza.
- 3.** Estudio de la estabilidad de la enzima α -amilasa en soluciones de tensioactivos tanto aniónicos como no iónicos mediante ensayos de actividad.
- 4.** Determinación de la eficacia detergente de diversas formulaciones detergentes con α -amilasa mediante ensayos de lavado, estudiando la influencia que ejerce la concentración de enzima, la temperatura y la presencia de tensioactivos aniónicos y no iónicos.
- 5.** Aplicación de la electrólisis del agua a la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Determinación de los parámetros óptimos para el lavado.
- 6.** Estudio de la influencia de distintas variables en el proceso de lavado mediante electrolimpieza, incluyendo la presencia de tensioactivos aniónicos y no iónicos en la solución de lavado.

Objectives

The industry of detergents and cleaning products has a high production volume with a wide range of different products. Only in Spain the annual turnover of detergent formulations based on surfactants in 2015 was 300 million euros and the estimation for production volume was 330.000 tonnes. This meant an increase of 42% with respect to year 2010 (INE, 2006). Within the detergents industry there is a subsector that manufactures specific products for applications in industry, restoration and hostelry meaning a 10% of the total market.

This market has undergone a substantial transformation in recent years due to the increase in consumption, in environmental requirements and in energy and raw materials costs. These are the reasons why the development of new cleaning formulations is required (Waldhoff and Spilker, 2005). This leads to the reassessment of actual formulations, looking for options environmentally friendly and more efficient. The use of biodegradable surfactants or surfactants with a natural origin, the decrease in the use of polyphosphates and the incorporation of nano- and micromaterials or highly stable enzymes in detergent formulations pursues the cleaning optimization as well as the compliance of the actual requirements in terms of price, energy saving, surface protection and biodegradability. On the other hand, new cleaning and disinfection methods have been developed and they are currently used in the food industry. These cleaning methods are based on water electrolysis, which generates electrolyzed water (EW) that provides high disinfection at low cost and minimum environmental impact (Huang *et al.*, 2008).

The cleaning process within the food industry is a critical operation. Food establishments have to market high-quality foods with highly demanding hygiene conditions. Thus, cleaning and disinfection need to be repeated regularly. This requires that cleaning procedures add chemical agents that leave surfaces physically and microbiologically clean, avoiding problems of hygiene and obstruction of equipment. Generally, these procedures are standardized and are usually analogous for different types of surfaces and soils. However, the precise composition must be optimized based on the soil that needs to be removed and the surface or material that has to be cleaned (Suárez *et al.*, 2012). Generally, the effectiveness of the cleaning process depends on numerous factors, such as the properties and concentration of the soiling agent, the properties of the substrate, the characteristics

of the washing device, washing temperature, detergent formula, hydrodynamic forces, and the duration of the process (Wildbrett, 2000).

Starch is one of the most important ingredients in food industry, being widely used for thickening, gelling, and as a water-retention agent as well as being part of a great variety of food products (Singh *et al.*, 2003). In industrial processes that use starches or their derivatives, these products often adhere to the surfaces inside pipes and accessories and are difficult to eliminate. The strength of the adhesion depends on the interaction between the starch and the pipe material (Liu *et al.*, 2006). Starchy fluids used can be classified as high viscosity liquids that require high temperatures for their elimination, depending on the concentration and the physical structure of the gel (Fryer and Asteriadou, 2009). Therefore, it is highly necessary to develop specific formulations that optimise the cleaning of starch adhered to hard surfaces and reduce the total costs of the process.

The objectives of this Ph.D. Thesis follow the lines of investigation of the research project “Ecological and specific surfactant formulations for different soils and substrates” (CTM2010-16770, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness”) and the research contract n^o 3128 signed by the partners Betelgeux S.L. and University of Granada “High performance hygiene processes in CIP systems by means of the development of new nanomaterials and chemical technologies (CIP-NANOTEC)”. These projects focus on the development of new liquid detergent formulations for industrial purposes. These formulations are specific for different types of soils (oil, protein and starch) and search for a higher economic performance and a lower environmental impact. Specifically, this Ph.D. Thesis focuses on the development of detergent formulations and new cleaning methods for the removal of dried starch adhered to stainless steel surfaces. To this effect, the following general objectives have been defined: the study of the influence on detergency of the incorporation in detergent formulations of micro- and nanoparticles and the enzyme α -amylase, assessing their performance by means of cleaning tests. Also, a new cleaning method for starch adhered to metallic surfaces using direct current has been developed, assessing the deterative performance obtained with this method. In order to achieve these main objectives, the research carried out was divided in the following specific goals:

1. Study of the interaction between aqueous solutions of non ionic surfactants and silica and magnetite particles.
2. Determination of the deterative effectiveness of dried starch adhered to stainless steel with different detergent formulations containing particles by means of cleaning tests. Study of the influence of different parameters on the cleaning process.
3. Study of stability of the α -amylase enzyme in anionic and non-ionic surfactant solutions by means of activity assays.
4. Determination of the deterative effectiveness of different detergent formulations with α -amylase by means of cleaning tests, studying the influence of enzyme concentration, temperature and presence of anionic and non ionic surfactants.
5. Application of water electrolysis to the cleaning of dried starch adhered to stainless steel. Determination of the optimal cleaning parameters.
6. Study of the influence of different factors on the washing process by electrocleaning, including the presence in the cleaning solution of anionic and non ionic surfactants.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Almidón. Características como agente de suculencia en la industria alimentaria

Los cultivos que contienen almidón forman una parte muy importante de la dieta humana y una gran proporción de los alimentos consumidos por la población mundial se produce a partir de ellos. Además de su uso directo como fuente de alimentación, el almidón modificado química o enzimáticamente es utilizado en la industria alimentaria como espesante, gelificante y agente de retención de agua (Singh *et al.*, 2003). También se utiliza para producir una gran variedad de alimentos como sopas, salsas, helado, snacks, cerveza, chocolate, pasteles, papillas o salchichas. El almidón hidrolizado también es un recurso valioso utilizado para la producción de siropes de glucosa y fructosa y productos no alimentarios como el etanol (Betancur y Chel, 1997). A pesar de que el almidón se encuentra ampliamente distribuido en las plantas como carbohidrato de reserva, sólo algunas de ellas tienen importancia a nivel industrial. La mayor fuente de almidón para uso industrial es el maíz, que representa más del 80% del mercado mundial (Jobling, 2004), seguido de la tapioca, patata y trigo.

En el interior de las plantas el almidón se acumula en forma de gránulos insolubles en agua. La forma y diámetro de los gránulos depende de su origen. Dentro de las fuentes de almidón de interés comercial, el tamaño de gránulo oscila entre 2-30 μm para el almidón de maíz y 5-100 μm para el almidón de patata (van der Maarel *et al.*, 2002). En la Figura 1.1 se muestran imágenes de microscopía de barrido electrónico (SEM) que ilustran las diferencias entre gránulos de almidón de patata y de maíz.

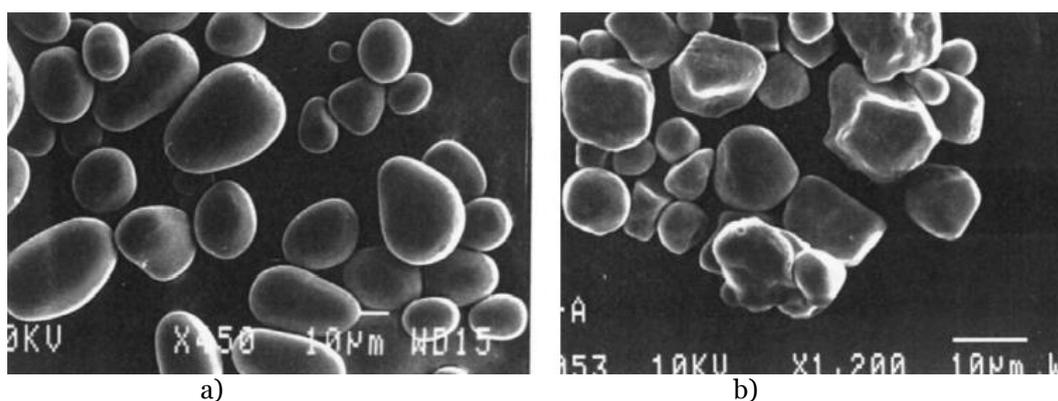


Figura 1.1. Micrografías de gránulos de almidón de patata (a) y maíz (b) (Singh *et al.*, 2003). (La barra representa una longitud de 10 µm)

El almidón es un polímero de glucosa anhidra, unida por el oxígeno de su carbono C1 mediante el llamado enlace glicosídico. El extremo de la cadena polisacárida que contiene el carbono anomérico libre (que no forma parte de un enlace glicosídico) se conoce como extremo reductor. Se compone de dos tipos de polisacáridos, la amilosa y la amilopectina.

La **amilosa** es un polímero lineal que se compone de hasta 6000 unidades de glucosa, unidas entre sí por enlaces glicosídicos α -1,4 (Figura 1.2). El contenido en amilosa del almidón varía dependiendo de la especie de origen, pero su valor típico oscila entre el 20 y el 25% (van der Maarel *et al.*, 2002). Las cadenas de amilosa adoptan una estructura de hélice, siendo de los primeros biopolímeros para los que se propuso esta conformación (Bertoft, 2004). En esta estructura todos los grupos hidrófilos están orientados hacia el exterior, mientras que los grupos hidrófobos quedan en el interior de la hélice. Esta propiedad hace a la amilosa susceptible de formar complejos con moléculas hidrófobas como el yodo, ácidos grasos o cadenas hidrocarbonadas.

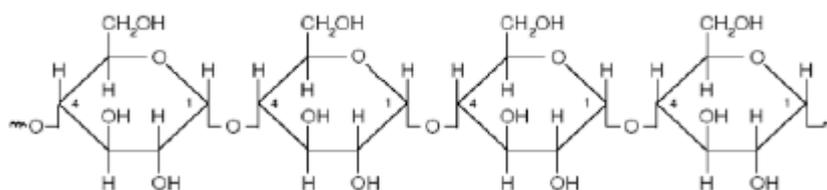


Figura 1.2. Estructura química de la amilosa

La **amilopectina** es el polímero mayoritario del almidón ya que típicamente supone entre el 70 y el 75% en peso. Se trata de una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa están unidas principalmente por enlaces α -1,4 cuando forman parte de cadenas lineales y por enlaces α -1,6 cuando actúan como nudo para formar ramificaciones (Figura 1.3). Alrededor del 5% de las unidades de glucosa están implicadas en los enlaces α -1,6. Una molécula de amilopectina contiene en promedio 2.10^6 unidades de glucosa, lo que la convierte en una de las mayores moléculas existentes en la naturaleza. Su peso molecular oscila entre 5 y 50.10^7 Da (Pérez *et al.*, 2009).

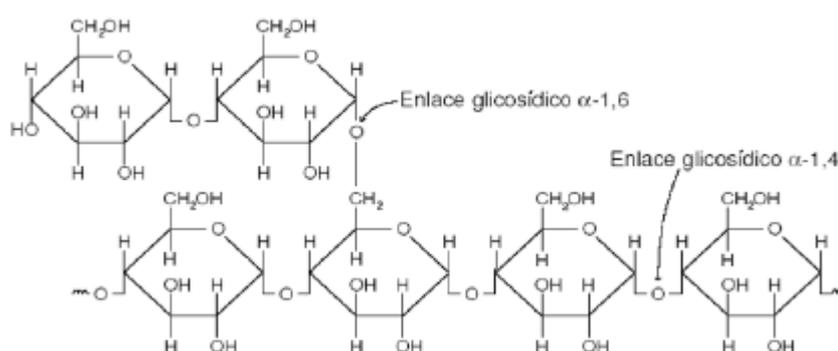


Figura 1.3. Estructura química de la amilopectina

Actualmente se acepta que la estructura de la molécula de amilopectina consta de un esqueleto de cadenas monoramificadas del que emergen familias de ramificaciones en forma de racimos (clusters). Estas ramificaciones, además, se organizan en forma de grupos cristalinos de doble hélice, como demuestra la difracción de rayos X a nivel nanoscópico (Jobling, 2004; Pérez *et al.*, 2009). En la Figura 1.4 se muestra esta conformación de la molécula de amilopectina, que condiciona la estructura microscópica del gránulo de almidón. Cada gránulo está compuesto por la alternancia de depósitos amorfos y semicristalinos de entre 100 y 800 nm de espesor denominados “anillos de crecimiento”. En este modelo, los puntos de ramificación en las moléculas de amilopectina se encuentran en las regiones menos organizadas (región amorfa). Así, la región cristalina está principalmente compuesta por amilopectina mientras que la región amorfa contiene amilosa y amilopectina enredadas entre sí (van der Maarel *et al.*, 2002).

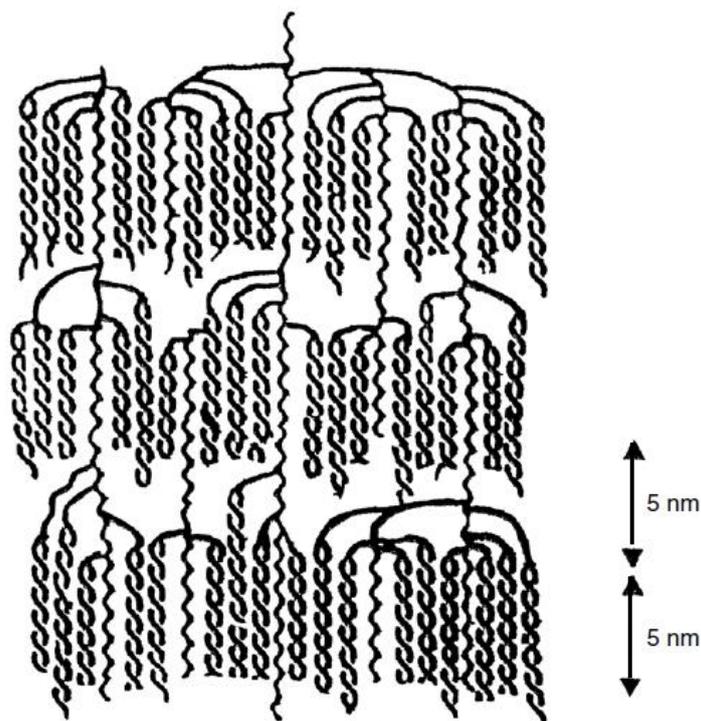


Figura 1.4. Modelo “cluster” de la molécula de amilopectina incorporando ramificaciones en doble hélice (Pérez *et al.*, 2009)

Gran parte del almidón consumido en la industria alimentaria ha sido sometido a algún tipo de procesado, el cual habitualmente incluye calentamiento en presencia de agua bajo algún tipo de esfuerzo cortante y posterior enfriamiento (Copeland *et al.*, 2009). Durante el tratamiento térmico los gránulos de almidón sufren un proceso de gelatinización que implica la absorción de agua y su hinchamiento por lo que su organización cristalina se degrada de forma irreversible. Experimentos con almidones normales y almidones céreos (con un contenido en amilopectina cercano al 100%) han llevado a la conclusión de que el hinchamiento (“swelling”) es una propiedad de la amilopectina (Tester y Morrison, 1990). Las temperaturas iniciales de gelatinización son características de cada tipo concreto de almidón pero generalmente se hallan en el intervalo 55-75°C. Se produce un exudado de la amilosa desde los gránulos, incrementándose la viscosidad de la mezcla hasta llegar a un máximo que se corresponde con el punto en que el número de gránulos hinchados, pero aún intactos, es también máximo. Si el proceso continúa, se produce un descenso en la viscosidad conforme los gránulos se rompen y las moléculas se dispersan en la fase acuosa.

Cuando la mezcla se enfría, las moléculas disgregadas de almidón forman inicialmente un gel y con el transcurso del tiempo se produce un proceso de

retrogradación en el que se van generando nuevos agregados semicristalinos, diferentes a los existentes en los gránulos del almidón nativo. Durante el enfriamiento la viscosidad aumenta de nuevo debido a la formación del gel, lo que implica interacciones moleculares entre la amilosa y la amilopectina.

Los alimentos ricos en almidón que han sido sometidos a calentamiento y enfriamiento a menudo contienen cantidades sustancialmente importantes de almidón retrogradado. El grado de gelatinización y/o retrogradación del almidón procesado influye en su capacidad para ser hidrolizado enzimáticamente. Los cambios morfológicos que se producen durante la gelatinización le hacen adquirir una estructura más asequible al ataque enzimático, mientras que la retrogradación dificulta la amilolisis (Slaughter *et al.*, 2001).

1.1.1 Comportamiento del almidón en el proceso de lavado

El lavado del almidón retenido en textiles o en superficies duras está influenciado fundamentalmente por las interacciones y fenómenos de degradación que experimenta cuando entra en contacto con los componentes de la solución detergente. Por ejemplo, la adición de α -amilasas a las formulaciones de lavado favorece la degradación de las manchas y depósitos y mejora la limpieza hidrolizando el almidón que puede actuar como “pegamento” para la adhesión de otras suciedades sobre las superficies. Además, la adición de enzimas a las fórmulas detergentes permite la utilización de temperaturas más bajas y la reducción del uso de ingredientes perjudiciales para el medio ambiente (Gupta *et al.*, 2003). La utilización de α -amilasas en el lavado de suciedades de almidón se describe en mayor detalle en el apartado 1.4.3.1.

Otro factor importante a considerar en los procesos de lavado de almidón es el pH de la disolución. En muchos procesos de limpieza las fórmulas detergentes contienen ingredientes que confieren al medio de lavado un carácter básico. El hidróxido sódico y otros álcalis inducen la despolimerización del almidón, especialmente cuando se aplica calor. Los agentes alcalinizantes tienen una mayor propensión a atacar las regiones amorfas de los gránulos de almidón, ricas en amilosa. Esto causa un incremento de la exudación de amilosa y también un cierto grado de hidrólisis de las cadenas del almidón (Lai *et al.*, 2004). En condiciones de

elevada alcalinidad se rompen los enlaces de hidrógeno intermoleculares del almidón, favoreciendo su solubilidad en agua. Sin embargo, la amilopectina es más difícil de disolver que la amilosa (Han y Lim, 2004). Los álcalis afectan a la estructura y comportamiento físico del almidón en disolución lo que genera cambios en sus propiedades funcionales como el poder de hinchamiento y su perfil de gelatinización (Wang y Copeland, 2012). El grado de degradación molecular y la composición de los productos de esta degradación depende de varios parámetros como la temperatura, la naturaleza y concentración del álcali y la presencia de oxígeno (Han y Lim, 2004). Sin embargo, cada tipo de almidón presenta una susceptibilidad diferente al tratamiento alcalino siendo el almidón de patata el más sensible a la hidrólisis y solubilización por tratamiento con álcalis (Nor Nadiha *et al.*, 2010).

El almidón también interacciona con los tensioactivos que forman parte de las soluciones detergentes. Diversos estudios han reflejado la formación de complejos de inclusión entre la amilosa, y en menor medida la amilopectina, con todo tipo de tensioactivos, tanto iónicos como no iónicos (Kim y Robinson, 1979; Hui *et al.*, 1983; Gudmundsson y Eliasson, 1990; Gudmundsson, 1992; Svensson *et al.*, 1996; Lundqvist *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c; Tanaka y Hoshino, 2002; Hoshino y Tanaka, 2003; Bravo *et al.*, 2008; Martínez-Gallegos *et al.*, 2011). La formación de complejos polímero-tensioactivo también tiene lugar con productos de la hidrólisis del almidón como las maltodextrinas (Wangsakan *et al.*, 2004).

Kim y Robinson (1979) comprobaron que diferentes tensioactivos formaban complejos de inclusión con la amilosa interfiriendo en su capacidad para formar complejos con el yodo. La estructura en hélice de la amilosa es especialmente apta para la formación de complejos. Hui *et al.* (1983) concluyeron que alrededor del tensioactivo se dispone la hélice de amilosa con interior hidrofóbico y flexible, lo que permite la formación de complejos con ligandos de diferentes tamaños. Svensson *et al.* (1996) comprobaron que tanto la amilosa como la amilopectina forman complejos con el tensioactivo aniónico SDS (dodecilsulfato sódico), si bien la capacidad de la amilopectina para ligar tensioactivo es menor que la de la amilosa. Esta dificultad de la amilopectina se debe a impedimentos asociados a su estructura ramificada en la que sólo las cadenas más externas pueden formar complejos. Por otra parte, Radhika y Moorthy (2008) estudiaron el uso del tensioactivo SDS para modificar las propiedades del almidón mediante la formación de complejos encontrando

diferencias sustanciales tanto en las propiedades térmicas como en la viscosidad del almidón tras el proceso de formación de complejos.

Bravo *et al.* (2008) y Martínez-Gallegos *et al.* (2011) han estudiado la formación de complejos de almidón de patata con tensioactivos no iónicos. El origen se debe a las interacciones hidrofóbicas (Hui *et al.*, 1983). Bravo *et al.* (2008) estudiaron la formación de complejos con alquilpoliglucósidos (APGs) y comprobaron que todos ellos se ligaban al almidón existiendo una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de tensioactivo ligado y la concentración de tensioactivo total, de modo que la formación del complejo continuaba hasta la formación de micelas sin poder detectarse saturación por parte del almidón. Los resultados mostraron que los APG se ligaban a la amilosa por unión cooperativa positiva y a la amilopectina por unión no cooperativa tipo Langmuir. En Martínez-Gallegos *et al.* (2011) se estudia la formación de complejos con alcoholes etoxilados (AEs) y alquilfenoles etoxilados (APEs). En este caso todos los tensioactivos también formaron complejos con el almidón pero sólo después de alcanzar una concentración de tensioactivo crítica para la asociación. Esto sugiere una menor afinidad con los tensioactivos etoxilados en comparación con los APGs. De nuevo encontraron que la cantidad de tensioactivo ligado aumentaba con su concentración hasta el comienzo de la micelización.

La formación de complejos entre el almidón y los tensioactivos presentes en los detergentes puede afectar a la eficacia del lavado. Por una parte, este fenómeno puede aumentar la solubilidad de los polímeros y por tanto la del almidón en el baño de lavado (Goddard, 1986), lo cual favorece el proceso detergente. Pero también hay que tener en cuenta que la formación de complejos a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) disminuye la actividad superficial para una concentración de tensioactivo determinada (Martínez-Gallegos, 2005). Por lo tanto, para mejorar los procesos de lavado del almidón se puede recurrir a tensioactivos con buena capacidad para formar complejos pero incorporando a la solución detergente una concentración suficiente para alcanzar la concentración micelar crítica.

1.2 Detergencia

La norma UNE-EN ISO 862:1996 define la detergencia como el “proceso según el cual la suciedad es separada de su sustrato y puesta en solución o en dispersión”. La detergencia tiene como objetivo la limpieza de la superficie, que tiene lugar en base a diversos fenómenos físicos ayudados por ciertas reacciones químicas que tienen lugar en las interfases entre el soporte, la suciedad y la solución de lavado.

La eficacia de un proceso detergente depende de las características del complejo “sustrato-suciedad” (donde el sustrato es la superficie a limpiar), de la composición química y de las propiedades físicas del medio que se utiliza para disgregar este complejo, de las condiciones de operación y del objetivo buscado al aplicar el proceso. Es por tanto un proceso muy complicado a causa de las numerosas interacciones entre los factores que intervienen en él. No obstante, la acción de la solución de lavado se puede describir en varias etapas: el mojado, el desplazamiento de la suciedad y la antiredeposición o mantenimiento de la suciedad separada de la superficie a limpiar (Vincent, 2002). A continuación se describen dichas etapas, con especial interés en los fenómenos relacionados con la detergencia de suciedades sólidas.

1.2.1 Mojado

El mojado resulta indispensable para conseguir que la materia activa del baño llegue hasta las superficies del sustrato y de la suciedad. A causa del carácter hidrófobo de estas superficies, su tensión interfacial frente al agua suele ser muy alta. Esto, junto con la rugosidad de la superficie de algunos sustratos, entorpece mucho el contacto directo del baño con las porciones de suciedad situadas en el interior del sustrato (Gómez Herrera, 1996).

Para separar la suciedad de la superficie a limpiar, la solución detergente debe entrar en contacto con ella y establecer una fuerza de adhesión más grande que la existente entre el sustrato y la suciedad. Para facilitar este proceso se añaden a la solución de lavado tensioactivos, es decir, agentes de superficie que tienen la propiedad de reducir la tensión superficial del baño de limpieza así como las tensiones interfaciales sustrato-baño y suciedad-baño.

Los líquidos mojan un cuerpo sólido como consecuencia de las acciones recíprocas que se producen en la superficie de separación de ambas fases (Kiermeier *et al.*, 2000). La intensidad humectante o adherente del líquido a un cuerpo sólido depende de la tensión superficial de este último (σ_S) y de la tensión superficial del líquido (σ_L), así como de la tensión existente en la superficie de separación de ambas fases ($\sigma_{S/L}$). Cuando una gota se deposita sobre una superficie sólida la acción conjunta de las fuerzas hace que ésta se extienda más o menos hasta que se alcanza un estado de equilibrio, tal y como se observa en la Figura 1.5. En este caso, fuerzas de expansión y de contracción son las que mantienen dicho equilibrio, expresado por la ecuación de Young:

$$\sigma_S = \sigma_L \times \cos\alpha + \sigma_{S/L} \quad \text{Ec.(1.1)}$$

donde α es el ángulo marginal del líquido sobre el sólido en estado de equilibrio. Un mojado completo de la superficie sólida por parte del líquido supone un ángulo de contacto $\alpha = 0^\circ$. Los tensioactivos en solución acuosa reducen el valor de dicho ángulo de contacto favoreciendo el mojado.

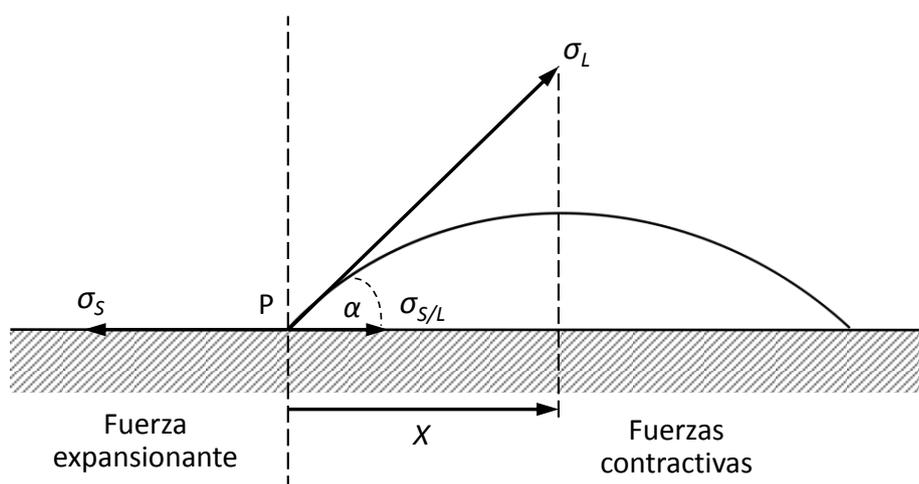


Figura 1.5. Balance de fuerzas en el mojado parcial de una superficie

1.2.2 Desplazamiento de la suciedad

La retención de los componentes de la suciedad sobre el sustrato es el resultado de la actuación de diversas fuerzas. Entre las más importantes se encuentran:

- Fuerzas de adsorción física (atractivas de Van der Waals). Estas fuerzas sólo son significativas a distancias pequeñas.
- Fuerzas electrostáticas.
- Fuerzas de quimisorción.
- Fuerzas mecánicas, tales como las que aparecen por macroclusión entre las fibras textiles o en rejillas metálicas.

La separación de la suciedad viene causada por diversos efectos y es función del proceso de lavado y del tipo de solución detergente. Entre dichos efectos se incluyen los exclusivamente mecánicos y los derivados de procesos químicos que tienen lugar cuando la suciedad es transformada mediante reacciones producidas por la presencia de ácidos, álcalis o enzimas en la solución detergente. Por último, la presencia de tensioactivos en el baño de lavado facilita la separación de la suciedad debido a fenómenos físicos de adsorción y a interacciones electrostáticas.

La separación física de la suciedad se basa en la adsorción no específica de tensioactivos sobre diferentes interfases implicadas en el proceso (sustrato-baño y suciedad-baño) así como en la adsorción específica de agentes complejantes sobre partículas polares de suciedad (Schwuger, 1982). Cuando se trata de suciedades sólidas no licuables, la adsorción de tensioactivos provoca una reducción en el trabajo requerido para separar la partícula del sustrato. Teniendo en cuenta que el trabajo de adhesión viene dado por la expresión (Gómez Herrera, 1996):

$$W_{ad} = \gamma_{SB} + \gamma_{PB} - \gamma_{SP} \quad \mathbf{Ec.(1.2)}$$

la adsorción del tensioactivo reducirá la tensión entre las interfases sustrato-baño y suciedad-baño (γ_{SB} y γ_{PB}), con el consiguiente descenso del trabajo requerido para separar la partícula de suciedad, donde γ representa la tensión interfacial y los subíndices S, B y P representan respectivamente el sustrato, el baño de lavado y la suciedad. Además, la presencia tanto del agua como de los tensioactivos provoca la formación de dobles capas eléctricas en las interfases sólido-líquido. Casi siempre estas dobles capas comunican cargas del mismo signo a las superficies del sustrato y de las partículas de suciedad, provocando la repulsión mutua. Esta repulsión se opone a las fuerzas atractivas de Van der Waals que mantienen unidos a suciedad y

sustrato, lo que conduce a un descenso en las fuerzas de adhesión resultantes y en la energía libre del sistema. La energía libre de cada una de estas capas que recubren suciedad y sustrato es función de la distancia y disminuye asintóticamente hasta un valor límite que corresponde a la condición de no interacción entre ambas (von Rybinski, 2007).

1.2.3 Separación de la suciedad de la superficie limpia

En función de la naturaleza de la suciedad son distintos los mecanismos que la mantienen dispersa en el baño de lavado y evitan su redeposición sobre el sustrato.

Cuando se trata de **suciedades oleosas líquidas**, los mecanismos que se consideran más eficaces y frecuentes para la mantener la dispersión son la solubilización en micelas y el emulsionamiento (Miller y Raney, 1993). La capacidad para solubilizar suciedades oleosas depende de la estructura química del tensioactivo, de su concentración en el baño y de la temperatura (Broze, 1995). El mecanismo de solubilización consiste en la dispersión espontánea de la suciedad insoluble gracias a los tensioactivos presentes en el baño de lavado, cuyo resultado final es la formación de una solución termodinámicamente estable. La contribución de la solubilización solamente resulta significativa a concentraciones de tensioactivos superiores a su concentración micelar crítica (CMC), alcanzando su máximo para concentraciones que sean varias veces superiores a la CMC. Sin embargo, la concentración de tensioactivos aniónicos que suele emplearse en formulaciones detergentes comerciales no suele ser muy superior a su CMC, por lo que la solubilización es a menudo insuficiente para dispersar toda la suciedad oleosa, quedando ésta dispersa en forma de emulsión (Gómez Herrera, 1996).

Una emulsión es un sistema heterogéneo de dos o más fases líquidas, constituido por una fase líquida continua (en este caso, la solución detergente hidrófila) y al menos una segunda fase líquida (la suciedad hidrófoba) dispersa en la primera en forma de finas gotitas. En los procesos de lavado la emulsificación se produce a través de la adsorción del tensioactivo sobre las interfases suciedad oleosa/agua y sustrato/agua, orientando su cola hidrofóbica hacia la grasa y su cabeza hidrofílica hacia el agua. La reducción de la tensión en estas interfases

desempeña un importante papel en el emulsionamiento (Gómez Herrera, 1996). Según Schwartz (1971), la emulsificación por sí sola no es capaz de promover la limpieza total del sustrato ya que, a diferencia de la solubilización, no puede impedir totalmente la redeposición de la suciedad. Otro proceso a evitar es el de coalescencia por el que las emulsiones terminan separándose en sus fases originales. Para evitar esto es necesaria la agitación mecánica del baño, el control de la temperatura o el uso de un agente anti-redeposición (Vincent, 2002).

En cuanto a la **suciedad compuesta por partículas sólidas**, el mecanismo más eficaz para mantenerla suspendida en el baño y prevenir su redeposición sobre el sustrato es la formación de barreras eléctricas y estéricas. El efecto electrostático es el resultado de la adsorción sobre las partículas sólidas de especies iónicas, generalmente aniónicas, procedente de tensioactivos o sustancias inorgánicas en el baño de lavado. Estas partículas sólidas pasan a estar fuertemente cargadas y la repulsión electrostática provoca su dispersión. Este mecanismo se presenta sobre todo en medios acuosos, porque la fuerte constante dieléctrica del agua permite el efecto máximo de las cargas electrostáticas.

Además del mecanismo de repulsión electrostática entre partículas tiene lugar otro mecanismo de repulsión denominado mecanismo estérico, que tiene lugar especialmente en baños que contienen tensioactivos en concentraciones superiores a su CMC. Los dispersantes de efecto estérico se adsorben igualmente sobre las partículas sólidas. Son generalmente moléculas poliméricas no iónicas que crean una capa protectora y evitan la reaglomeración de las partículas por efectos de repulsión termodinámica general (Napper y Netschey, 1971). Los tensioactivos no iónicos actúan como eficaces barreras estéricas, especialmente los basados en cadenas de óxido de etileno, cuyas cadenas hidrófilas se orientan hacia el baño.

1.3 Métodos de limpieza en la industria alimentaria

Los procesos de limpieza y desinfección son partes esenciales de la operación diaria en una industria alimentaria (Fryer y Asteriadou, 2009) debido principalmente a:

- La pérdida de rendimiento causada por la deposición de sólidos en los equipos, lo que conduce a altas pérdidas de presión y una reducción en la eficacia de la transmisión de calor en la planta de proceso.
- Al posible daño causado al producto por el crecimiento de microorganismos.
- A la necesidad de retirar los depósitos de suciedad entre distintos ciclos de producción para eliminar la contaminación, especialmente importante cuando se fabrican diferentes productos en la misma línea de proceso.

El resultado de un procedimiento de limpieza correcto debe corresponderse con una superficie físicamente, biológicamente y químicamente limpia (Bénézech y Lalande, 2002). Físicamente limpia significa que ninguna suciedad debe ser físicamente detectable, biológicamente limpia que ningún microorganismo indeseable debe sobrevivir y químicamente limpia que ningún elemento extraño debe ser detectable por métodos de determinación química. Para la limpieza de equipos e instalaciones de proceso la industria alimentaria utiliza habitualmente los sistemas “cleaning in place” (CIP). Los sistemas CIP proporcionan una limpieza consistente y reproducible, permitiendo una trazabilidad total de las condiciones de lavado.

1.3.1 Sistemas de limpieza CIP

Los sistemas CIP se basan en la circulación de soluciones de lavado (detergentes y/o desinfectantes) a través de los equipos de producción (tanques, tuberías, intercambiadores de calor,...) que permanecen montados en su configuración habitual. Estas soluciones de lavado entran en contacto con la suciedad en condiciones de elevada turbulencia y velocidad de flujo (Moerman *et al.*, 2014). Un ciclo de limpieza consta generalmente de:

- i) Aplicación de agua y/o aire para recuperar el producto presente en las tuberías y los equipos a limpiar, de manera que se reduzca al mínimo la pérdida del mismo. Así también se facilita la limpieza y se reduce la contaminación de los efluentes.

- ii) Enjuagado inicial con agua, que evita que se seque la suciedad residual. El estado y composición de la suciedad puede cambiar durante el tiempo que transcurre entre el final del trabajo y el comienzo de la limpieza, lo que se conoce como “envejecimiento” (Kiermeier y Wildbrett, 2000). La aplicación de agua de forma intermitente es más eficaz (por ejemplo, 3 secuencias de enjuagado de 30 segundos seguidas de 30 segundos de escurrido).
- iii) Limpieza por circulación de una disolución detergente caliente en circuito cerrado, con o sin recuperación de la misma.
- iv) Enjuagados intermedios, con o sin reciclado, con el objetivo de eliminar toda traza de detergente que pueda ser medida por pH-metría o conductimetría.
- v) Aplicación eventual de una segunda disolución detergente. Distintos tipos de detergentes son a veces utilizados de forma consecutiva con enjuagados intermedios (alcalino-enjuagado-ácido-enjuagado...).
- vi) Desinfección. En numerosos casos el desinfectante se inyecta en la corriente de circulación de agua de enjuagado. Se recircula y se continúa con un tiempo de parada en el que la instalación queda en contacto con el desinfectante.
- vii) Enjuagado final con agua potable. Esta etapa no se realiza en algunos países como Estados Unidos, en los que se suele utilizar desinfectante que no precisa de aclarado posterior (Bénézech y Lalande, 2002).

La elección del tipo de sistema CIP a utilizar dependerá del tamaño y de la complejidad de la instalación industrial, pero también del tipo de suciedad. Se distingue normalmente entre varios tipos de estaciones CIP:

Sistemas CIP de empleo no recuperable: Es el sistema más simple y de coste de inversión más bajo. Es interesante para limpiar unidades muy pequeñas o elementos muy sucios, lo que limita el interés de reutilizar la solución de limpieza. Este tipo de sistema CIP comprende en general un depósito de preparación y envío de la solución de limpieza, una bomba, válvulas y un sistema de inyección directa de detergente, y a menudo de vapor, para mejorar la operación de limpieza aumentando la temperatura. No hay depósitos de almacenamiento. Estos sistemas

se utilizan especialmente en la industria farmacéutica, debido al riesgo de contaminación que podría ocurrir por el reciclado de las soluciones de limpieza, pero son escasamente utilizados en la industria agroalimentaria (Rizoulières *et al.*, 2009).

Sistemas CIP de empleo repetido: En este caso son necesarios varios tanques que contienen detergentes alcalinos o ácidos, desinfectantes o incluso agua para el empuje de las soluciones de lavado y para los enjuagados intermedios (Figura 1.6). Todos los tanques están interconectados por tuberías provistas con válvulas y colectores ajustados con las bombas de suministro y de retorno del sistema CIP.

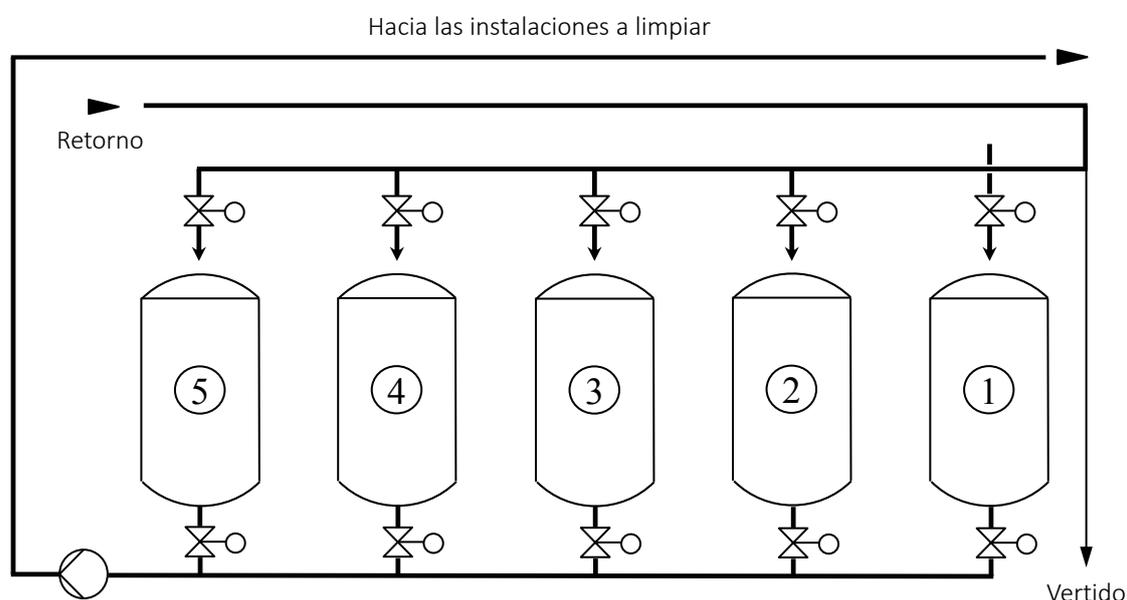


Figura 1.6. Esquema de estación CIP de empleo repetido (Bénézech y Lalande, 2000)

1. Agua; 2. Desinfectante; 3. Ácido; 4. Sosa; 5. Recuperación de agua.

Los sistemas de empleo repetido son más complejos que los de empleo no recuperable, siendo mayor la inversión inicial. Sin embargo, el periodo de amortización es corto gracias al ahorro en agua, detergentes y energía (Moerman *et al.*, 2014). Bénézech y Lalande (2002) indican que este tipo de instalación no responde a las restricciones técnicas de hoy en día debido a las dificultades de adaptación rápida a condiciones de limpieza muy variadas, por lo que defienden la utilización de sistemas mixtos.

Dentro de los sistemas CIP de empleo repetido, se optará por un sistema con un mayor o menor grado de centralización en función de criterios como el tamaño de la planta, el ahorro en costes y la seguridad que debe presentar el producto:

- Los **sistemas CIP centralizados** se utilizan normalmente en plantas pequeñas donde la distancia entre la estación CIP y el equipamiento a limpiar es relativamente corta. Su principal inconveniente es el coste. Las soluciones de limpieza y las aguas de enjuagado deben transportarse a largas distancias, con lo que aumentan las pérdidas de calor y se requieren mayores volúmenes de agua y de agentes detergentes (Auerswald, 2000). En cambio, los productos utilizados se almacenan en una única localización, lo que es beneficioso para la seguridad y la higiene del proceso.
- Las **unidades CIP centralizadas con varias estaciones satélite** cuentan con tanques centralizados para las soluciones detergentes ácidas y alcalinas, las cuales se distribuyen hacia unidades CIP satélite en diversas áreas de producción. El aporte y calefacción de las aguas de enjuagado se hace de forma cercana. De esta forma se permite minimizar el volumen de solución de lavado que sería justo el suficiente para llenar el circuito a limpiar. Así se puede optimizar la composición de la solución detergente para cada circuito en función de sus necesidades de limpieza (Moerman *et al.*, 2014).
- Los **sistemas CIP descentralizados** cuentan con una unidad de abastecimiento en cada instalación de producción, con los recipientes correspondientes para las soluciones limpiadora y desinfectante, instrumentos de dosificación y graduación, bombas y medios de control. Se recomiendan en grandes plantas de proceso donde la distancia entre una estación CIP centralizada y circuitos CIP periféricos sería extremadamente larga. Este sistema permite reducir las pérdidas de calor, así como el volumen de aguas residuales asociado al proceso de limpieza. Sin embargo, resulta muy costoso dotar a cada instalación de producción con una instalación de limpieza propia.

1.3.2 Factores que determinan la eficacia de las operaciones de limpieza

Independientemente del diseño y de la configuración del sistema utilizado, el control óptimo del CIP necesita un buen conocimiento de los parámetros que determinan la eficacia de la limpieza. En la Figura 1.7 se representan dichos parámetros, de acuerdo con Wildbrett (2000).

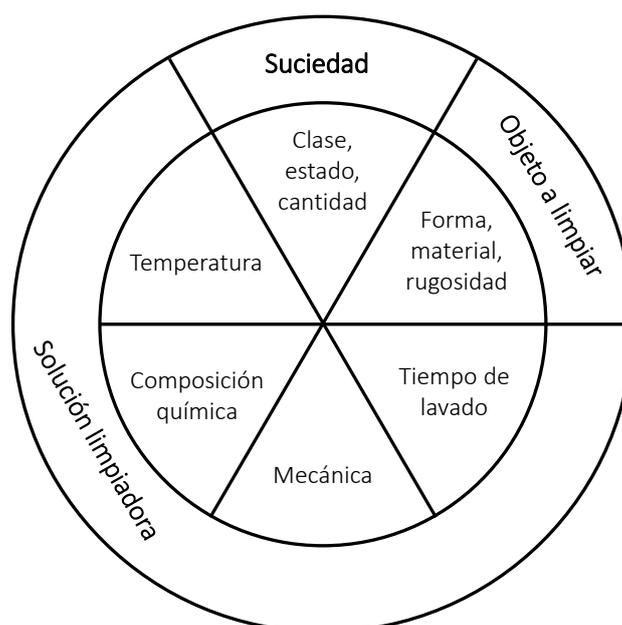


Figura 1.7. Parámetros con influencia sobre la eficacia de la limpieza húmeda

A continuación se profundiza en estos factores, a excepción de los componentes de formulaciones detergentes que se describen en el apartado 1.4.

1.3.2.1 Características de la suciedad

El análisis de la composición, la estructura, el reparto y el tipo de suciedad producida durante el procesado del alimento es imprescindible con el fin de adaptar el detergente y el protocolo de limpieza al depósito producido. Estos depósitos dependerán de las condiciones de proceso y del equipo utilizado. Además, por su composición y su estructura física, las suciedades procedentes de alimentos son en la mayoría de los casos complejas y heterogéneas (Leclercq-Perlat, 2002).

Epstein(1978)realizó una clasificaciónde los depósitos que se forman sobre superficies duras que ha sido ampliamente utilizada. Esta clasificación en cinco categorías no se basa en la naturaleza del depósito sino en el mecanismo por el cual se produce. Este enfoque permite agrupar y comparar información sobre depósitos procedentes de distintas industrias. Según esta clasificación los mecanismos de ensuciado son:

- **Reacción.** El depósito resulta de la reacción de algún componente del fluido en circulación (por ejemplo, desnaturalización de proteínas en la industria láctea).
- **Biológico.** Este mecanismo puede ocurrir a varias escalas, desde la adhesión de organismos simples al crecimiento de biopelículas (Boulané-Petermann, 1996).
- **Cristalización o precipitación:** Un componente disuelto en el fluido se deposita cuando excede su límite de solubilidad (como la precipitación de carbonato o fosfato cálcico desde agua hirviendo). Una subclase es el **ensuciado por solidificación** del fluido o alguno de sus componentes sobre la superficie. Ejemplos son la solidificación de hielo a partir de agua o de almidón desde un fluido alimentario(Fryer y Asteriadou, 2009).
- **Particulado:** Se produce por adhesión de partículas que se transfieren desde la fase líquida a la superficie como ocurre en la deposición de partículas de magnetita suspendidas en el agua de refrigeración o agregados de proteínas sobre las superficies (Simmons *et al.*, 2007).
- **Por corrosión:** Esta suciedad se genera por corrosión de la superficie. A menudo los productos de corrosión se transportan desde los fluidos para formar depósitos en las superficies sólidas.

Fryer y Asteriadou(2009) introdujeron una clasificación de suciedades en función de la complejidad a la hora de afrontar su limpieza:

Fluidos de baja viscosidad: El fluido que constituye el “depósito” tiene propiedades similares a la del agua. Ejemplos son la limpieza de tuberías y tanques

que contienen leche o cerveza entre ciclos de proceso. Las operaciones de limpieza en este caso pueden llevarse a cabo simplemente con agua como líquido de limpieza.

Fluidos de alta viscosidad: El depósito es altamente viscoso (viscoelástico o viscoplástico). La viscosidad aparente de estos fluidos es miles de veces superior a la del agua. Los depósitos de almidón gelificado y húmedo se pueden incluir en esta categoría. Su eficacia de lavado sobre diferentes sustratos ha sido estudiada, por ejemplo, por Jurado *et al.* (2011c) que también estudia la fuerte dependencia de la viscosidad del gel de almidón con la temperatura.

Sólidos cohesivos: En estos casos el depósito se comporta como un sólido existiendo una gran variabilidad de materiales que los constituyen y mostrando diferentes propiedades. Se pueden encontrar desde geles de proteínas formados a partir de leche u otros fluidos alimentarios hasta suciedades sólidas muy duras generadas por minerales precipitados como es el caso de los depósitos generados a partir de leche sometida a temperaturas UHT.

Las suciedades sólidas cohesivas son las que presentan mayores dificultades en los procesos de limpieza. Serán necesarios agentes químicos para disolver el depósito o bien transformarlo de forma que pueda ser retirado del sustrato. La naturaleza del depósito determinará el tipo de agente químico a utilizar, siendo típico el uso de hidróxido sódico para la retirada de depósitos orgánicos y ácidos para la limpieza de depósitos minerales (Schmidt, 1997). El lavado tendrá lugar por efectos derivados de la acción mecánica del líquido de limpieza pero también por difusión de los agentes químicos hacia la suciedad y por los procesos químicos/físicos que puedan desarrollarse en ella (saponificación, hidrólisis ácida, alcalina o enzimática, emulsificación, fusión). Los mecanismos químicos implicados son:

- **Disolución:** Tiene lugar en la limpieza de sales minerales con ácido, de proteínas con álcalis o de azúcares con agua. El proceso de lavado está controlado por la transferencia de masa desde y hacia la superficie, por la cinética de disolución o por transferencia de calor si el depósito se está fundiendo.

- **Fallo cohesivo:** La limpieza tiene lugar por ruptura de las fuerzas cohesivas existentes en el interior del depósito, dejando parte de la suciedad aún sobre el sustrato.
- **Fallo adhesivo:** Se produce la retirada del depósito por desprendimiento de la superficie debido a la ruptura de las fuerzas adhesivas que unen al depósito con el sustrato. El depósito se desprenderá del sustrato a trozos, sin dejar residuo en las zonas en las que estaba adherido.

La clasificación de depósitos en adhesivos y cohesivos puede ser útil tanto para la selección de los protocolos de limpieza como para la elección del tipo de superficie más adecuado para minimizar los fenómenos de adhesión. Liu *et al.* (2006a, 2006b) han utilizado una sonda de micromanipulación para estudiar depósitos representativos de las suciedades que se encuentran habitualmente en la industria alimentaria (salsa de tomate y miga de pan como depósitos amiláceos, suero lácteo y albúmina de huevo como depósitos proteicos), identificando los efectos cohesivos y adhesivos en la limpieza. Observan que en las suciedades amiláceas, especialmente en la salsa de tomate cocinada y seca, la eliminación tiene lugar de forma abrupta por fallo adhesivo entre la superficie y el depósito, mientras que las suciedades proteicas tienden a ser eliminadas en “capas” debido a que muestran unas menores fuerzas de cohesión. Sin embargo, Gerhards y Schmid (2013) estudiaron la limpieza con agua de depósitos de almidón sobre acero inoxidable y encontraron que las fuerzas de adhesión eran más importantes, eliminándose el depósito de forma gradual con el enjuagado.

Utilizando gránulos de almidón seco procedentes de una suspensión acuosa y depositados sobre distintas superficies, Detry *et al.* (2011) observaron que tras el secado del almidón la interfaz entre los gránulos y el sustrato es ocupada por moléculas que inicialmente están disueltas en la fase acuosa de la suspensión y posteriormente son adsorbidas o transportadas desde la película acuosa y depositadas sobre las superficies. Estas macromoléculas son principalmente polisacáridos y actúan como adhesivo, dificultando la limpieza del sustrato. Schöler *et al.* (2012) también estudian la limpieza de depósitos de almidón de maíz seco desde su carácter de sólido con elevadas fuerzas de cohesión.

En general, predominará la limpieza por fallo adhesivo cuando la unión del depósito con la superficie sea menos fuerte (en rangos de energía superficial libre de 22 a 28 mN/m). En la limpieza de suciedades que presenten fallo adhesivo, el uso de superficies modificadas de forma que su energía superficial se encuentre en el rango de mínima adhesión permitirá facilitar la limpieza, si bien el efecto de la superficie descende con el aumento de espesor del depósito sólido (Liu *et al.*, 2006a). La limpieza por fallo cohesivo tendrá lugar preferentemente a altas temperaturas y elevada concentración de agentes químicos en la solución de lavado, pues la velocidad de reacción, y por tanto de alteración de la suciedad, es mayor en dichas condiciones (Fryer y Asteriadou, 2009).

1.3.2.2 Superficies a limpiar

La posibilidad de llevar a cabo una limpieza y desinfección eficaz depende de las instalaciones y dispositivos técnicos, así como de la clase y características de los materiales empleados en su construcción. Los equipos e instalaciones que vayan a entrar en contacto con los alimentos deben estar diseñados de manera que puedan limpiarse, desinfectarse o esterilizarse. Esto exige un contacto directo y sin obstáculos de las superficies con las soluciones de lavado. Deben evitarse por ello los espacios muertos, aguas remansadas y puntos de difícil acceso, así como las grietas y ranuras.

Wildbrett (2000) detalla algunos de los puntos de difícil limpieza en la industria alimentaria. Entre otros, plantean problemas los cierres a rosca o a presión ya que siempre dejan resquicios. Estos cierres “permeables” deben considerarse por tanto puntos críticos. Otro peligro de reinfección lo constituyen las sondas medidoras utilizadas para controlar la temperatura, la presión o el volumen. Los agitadores existentes en tanques y depósitos también dificultan su completa limpieza y desinfección. El diseño de la instalación CIP deberá tener en cuenta estos puntos críticos para garantizar el éxito en las operaciones de limpieza.

Las características de las superficies a limpiar también tienen una importancia primordial para garantizar la efectividad de la limpieza. Diversos trabajos han estudiado los materiales de uso más frecuente en la industria alimentaria y la influencia de su composición química, tratamientos superficiales, rugosidad o envejecimiento en su facilidad de limpieza (Wildbrett y Sauerer, 1989; Holah *et al.*,

1989; Verran *et al.*, 2000). El acero inoxidable es la superficie preferida para la construcción de equipamiento en la industria alimentaria tal y como se especifica en numerosas normas y regulaciones para diseño y construcción industrial (Schmidt, 1997). Así, los aceros inoxidables de la serie ASTM 300 se utilizan habitualmente para equipos utilizados en la industria láctea, mientras que la serie 400 es más apropiada para aplicaciones específicas como productos con alto contenido en grasas o en la industria cárnica. También es frecuente el uso de aceros más resistentes a la corrosión en industrias que manejan productos con una elevada acidez o alto contenido salino.

La eficacia de lavado de las superficies de acero inoxidable ha sido estudiada por numerosos autores. En cuanto a limpieza biológica, el acero inoxidable es comparable al vidrio siendo significativamente mejor que los plásticos, el aluminio o el cobre. Los microorganismos de biopelículas desarrolladas sobre superficies de acero inoxidable pueden ser eliminados con menor concentración de desinfectante de la requerida para superficies poliméricas (Boulané-Petermann, 1996). Con la ayuda de un método estandarizado, Leclercq-Perlat y Lalande (1994) testaron la facilidad de limpieza de una suciedad orgánica (yogur seco) que se adhiere a diferentes materiales industriales (vidrio, acero inoxidable 304L, PVDF y PMMA). Para un mismo estado de superficie razonablemente liso a escala microscópica, las diferencias alcanzadas en el proceso de limpieza son debidas esencialmente a la composición química de la superficie siendo los plásticos fluoruro de polivinilideno (PVDF) y polimetilmetacrilato (PMMA) más fácilmente limpiables que el vidrio y el acero inoxidable. Más recientemente, Detry *et al.* (2011) estudiaron la adherencia y posterior limpieza de gránulos de almidón seco depositados sobre diferentes superficies como vidrio, acero inoxidable 304-2R, poliestireno y politetrafluoroetileno (PTFE). Los agregados de gránulos de almidón adheridos presentaban distintas morfologías dependiendo del tipo de sustrato, no sólo en cuanto a tamaño sino también en cuanto a estructura tridimensional, mostrando una mayor adherencia la superficie más hidrófila (vidrio) y una mayor facilidad para el desprendimiento de los agregados en los materiales plásticos, altamente hidrofóbicos. Las superficies plásticas, a pesar de su facilidad de limpieza, presentan problemas debido a su baja resistencia a la corrosión, sufriendo fenómenos como el agrietamiento por tensión ante exposiciones prolongadas a materiales alimentarios corrosivos o agentes de limpieza (Schmidt, 1997).

Centrando el estudio en las superficies de acero inoxidable, Leclercq-Perlat y Lalande(1994) estudiaron distintos acabados industriales del acero inoxidable 304L, encontrando que las superficies que se limpian peor son las que tienen más defectos de superficie. Esto puede deberse al aumento de la superficie de adhesión y a una mayor protección de ciertas zonas de la superficie frente a las fuerzas de arrastre de la solución de lavado. Para un mismo acabado de dicho acero inoxidable 304 L, Leclercq-Perlat *et al.*(1994)estudian el efectoque tiene la modificación química de la superficie provocada por diferentes métodos de limpieza (tensioactivos comerciales, limpieza ácida, alcalina y mixta ácida/alcalina) sobre su lavado.No detectó que la topografía del material tuviera una influencia notable incluso tras una utilización prolongada. Asimismo, la facilidad de limpieza no se alteró en superficies sometidas a diez ciclos de lavado en comparación con superficies sometidas sólo una vez a la limpieza industrial.

Karlsson *et al.* (1998)utilizaron proteína de lactosuero como suciedad y compararon mediante elipsometría el comportamiento de tres tipos de acero inoxidable (304, 316 y SS2378) frente al ensuciado y facilidad de limpieza, no encontrando diferencias significativas entre ellos. Centrando el estudio en el tipo 304, compararon la superficie sin pretratamiento químico y la superficie pasivada por inmersión en ácido nítrico, obteniendo que la facilidad de limpieza de la superficie no pasivada era considerablemente superior a la de la superficie pasivada. Sin embargo, no observaron diferencias entre ellas en cuanto a la tendencia al ensuciado y formación de depósitos.Más recientemente, Bobe *et al.* (2007) han estudiado la influencia que tiene sobre la limpieza de levaduras y esferas de poliestireno la rugosidad y la energía superficial que confieren diferentes tratamientos de acabado a una superficie de acero inoxidable 316L. El estudio se centra en un rango de rugosidades superficiales de 0.15 a 2 μm , no encontrando diferencias en la eficacia de lavado, a diferencia de los resultados obtenidos en Leclercq-Perlat y Lalande(1994). Con respecto a los distintos recubrimientos (diversos tipos de sílice y carbono amorfo), la fuerza media requerida para separar las partículas disminuía conforme lo hacía la energía superficial. Otros estudios sobre la eficacia de limpieza en superficies de acero inoxidable se pueden encontrar en Detry *et al.* (2010).

1.3.2.3 Tiempo de lavado

En contraposición a los parámetros hasta ahora contemplados, el tiempo de lavado no es propiamente una magnitud independiente ya que dependerá de los demás factores que habitualmente determinan el éxito del proceso de limpieza. Pero el hecho de que el tiempo de actuación pueda fijarse a voluntad dentro de ciertos límites justifica considerarlo como parámetro propio, máxime si se tiene en cuenta que el éxito de muchas medidas higiénicas depende en gran medida de que el tratamiento de limpieza sea suficientemente prolongado debido a que la limpieza y la destrucción de gérmenes exigen largos períodos de tiempo (Wildbrett, 2000). Entre los procesos que requieren un tiempo menor se encuentran la difusión de la solución en los depósitos coloidales de la suciedad y su posterior hinchamiento, la difusión de la solución a través de la pared celular hasta el interior de las células de los microorganismos, el humedecimiento de superficies grasas, la difusión de porciones de suciedad disueltas o transformadas químicamente y el desdoblamiento de las sustancias previo a la disolución de la suciedad, como es el caso de las enzimas.

Mantener el lavado un tiempo superior al requerido para alcanzar el máximo de eficacia del proceso detergente no supone ventaja alguna, pues la redeposición aumenta con el transcurso del tiempo. Por otra parte, con el tiempo aumenta el grado de hidrólisis de algunos tensioactivos aniónicos lo cual afecta desfavorablemente a su eficacia. Además, un contacto prolongado entre la superficie del sustrato y algunos de los componentes del baño también puede perjudicar la eficacia detergente (Gómez Herrera, 1996).

En la práctica, un procedimiento completo de validación y ensayo permite determinar los tiempos de enjuagado y contacto con la solución de lavado más adecuados para limpiar cada parte de los equipos de proceso. Sin embargo, la forma más rápida de asegurar una correcta limpieza tras los ciclos de lavado es la inspección visual en algunas partes críticas de los equipamientos de proceso tales como placas de calentamiento, codos de los tubos o conexiones a depósitos (Bénézech y Lalande, 2002; Moerman *et al.*, 2014).

1.3.2.4 Acción mecánica y fuerzas hidrodinámicas

Generalmente, el proceso detergente exige agitación mecánica para alejar de la superficie del sustrato las porciones de suciedad solubilizadas, emulsionadas y suspendidas. Para lograr una limpieza eficaz mediante líquido en movimiento hay que procurar en todos los casos una corriente turbulenta (Wildbrett, 2000; Moerman *et al.*, 2014). A medida que aumenta la velocidad del líquido se acorta el trayecto que deben superar mediante difusión las partículas de suciedad químicamente tratadas hasta el interior de la corriente. Además la difusión se ve acelerada porque la creciente velocidad de la corriente aumenta también la diferencia de concentración existente entre las capas de líquido adherida y en movimiento. Parámetros usados habitualmente para caracterizar el flujo como la velocidad de la corriente o el número de Reynolds sólo describen de forma limitada los procesos de limpieza desde el punto de vista mecánico, puesto que éstos transcurren primariamente en la superficie de separación sólido-líquido. Por ello se utiliza el esfuerzo cortante en la pared como el parámetro más adecuado para cuantificar esta influencia en los modelos cinéticos de limpieza (Bénézech y Lalande, 2002).

Desde hace años, se considera adecuada una velocidad de solución limpiadora de 1.5 m/s como valor de referencia en el diseño de sistemas CIP. Normalmente la velocidad es un criterio simple más utilizado que el caudal. En principio, velocidades mayores a 1.5 m/s no proporcionan mejores resultados de limpieza en sectores como la industria láctea (Timperley y Smeulders, 1988). Incluso si la velocidad es demasiado alta el flujo puede causar daño en los equipos, particularmente en las juntas. A la hora de seleccionar la capacidad de la bomba del suministro CIP es importante considerar que el flujo debe superar la caída de presión en el sistema de tuberías, resultante de la fricción en las propias conducciones, en codos, bifurcaciones y otros equipamientos o instrumentos instalados.

Diversos estudios se han realizado en torno a la influencia de las fuerzas hidrodinámicas en la retirada de partículas o suciedades sólidas de diferentes sustratos. En el caso de la retirada de partículas en condiciones de flujo turbulento, Cleaver y Yates (1973) mostraron que existe un esfuerzo cortante mínimo sobre la superficie del sustrato para la eliminación de las partículas y que dicha magnitud depende del tamaño de partícula. Sharma *et al.* (1992) estudiaron la influencia de la

velocidad de flujo, tamaño y elasticidad de las partículas, fortaleza iónica, pH y gravedad en la eliminación de partículas coloidales, utilizando el concepto de fuerza hidrodinámica crítica por debajo de la cual no se produce el desprendimiento de las partículas del sustrato. Batra *et al.*(2001)también describen la naturaleza de la fuerza hidrodinámica crítica, indicando que depende de la rugosidad de la superficie, del tamaño de las partículas y de otros parámetros del sistema. Estos investigadores consideran que, una vez adsorbido el tensioactivo sobre las distintas superficies, el principal mecanismo de eliminación de la suciedad es la acción de las fuerzas hidrodinámicas.

En un estudio sobre la limpieza CIP de depósitos de proteína de lactosuero Gillham *et al.* (1999) concreta la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el mecanismo de lavado, concluyendo que la limpieza tiene lugar en tres etapas: hinchamiento de la suciedad, erosión uniforme y una fase de declive en la que tiene lugar la limpieza de la película adherida directamente al sustrato. Trabajando en un rango de número de Reynolds (Re) entre 500 y 5000, obtienen que la etapa de erosión uniforme de la suciedad está controlada principalmente por la temperatura y las condiciones en la interfase depósito/solución de lavado, mientras que la fase de declive depende fuertemente de las condiciones de flujo y por tanto, del esfuerzo cortante aplicado. Sin embargo, el efecto de las fuerzas hidrodinámicas no es igual para todas las suciedades:recientemente se ha encontrado quecuando la suciedad es proteína de lactosuero, el incremento en el flujo de circulación conduce a un aumento en la velocidad de lavado muy superior al obtenido para la limpieza de almidón de patata en las mismascondiciones de ensayo(Otto *et al.*, 2014).

La condición de flujo estacionario se puede modificar aplicando un movimiento fluido oscilante (limpieza por flujos pulsados). Sus beneficios han sido estudiados por Augustin *et al.*, (2010), Föste *et al.*,(2013) y Schöler *et al.*, (2009) utilizando almidón como suciedad modelo en los procesos de limpieza CIP, tanto en conducciones lisas como en secciones de difícil acceso.

1.3.2.5 Temperatura

El aumento de temperatura suele favorecer los procesos de lavado, pero la importancia de este efecto depende de los agentes de limpieza y del tipo de suciedad. El fenómeno de adhesión sobre superficies es exotérmico (Jennings, 1965), por lo

que para arrancar los depósitos de suciedad será necesario aportar energía. El movimiento molecular browniano, el coeficiente de difusión, la viscosidad de las grasas y otras suciedades líquidas o gelificadas, así como la solubilidad de las sales sufren un cambio con la temperatura, de forma que la retirada de los depósitos se acelera y facilita (Schwuger, 1982). La temperatura también acelera la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas en el baño de lavado. Recientemente Goodeet al. (2013) han recopilado la literatura más reciente sobre procesos de limpieza basados en agua y utilizados en la industria alimentaria, concluyendo que para los depósitos sólidos la temperatura es el principal factor que contribuye a la limpieza, siendo el que determina el tiempo de lavado tanto a altas como a bajas velocidades de flujo así como con altas y bajas concentraciones de detergentes.

En la práctica la gama de temperaturas posibles estará limitada. Cuanto mayor es la temperatura más rápidas son las reacciones pero se pueden producir reacciones químicas indeseables entre los detergentes y los materiales de los equipos que se limpian. Una temperatura excesivamente elevada también puede causar la desnaturalización de suciedades del tipo proteicas, la desestabilización de enzimas o la disminución de la solubilidad de componentes de la solución de limpieza. Las bajas temperaturas, que preservan los equipos, hacen la operación de limpieza demasiado larga y por lo tanto no viable económicamente. El control de la temperatura es preciso para optimizar las etapas del proceso de lavado en las que tiene un papel principal, lo que tiene lugar sobre todo tras la etapa inicial de hinchamiento del depósito sólido (Gillham et al., 1999).

El efecto de la temperatura en el equilibrio de adsorción y en la difusión de los tensioactivos es particularmente importante. En sistemas que contienen tensioactivos aniónicos se produce un incremento en la eficacia de lavado con el aumento de la temperatura (Schwuger, 1982). Sin embargo, cuando se utilizan tensioactivos no iónicos hay que tener en cuenta el punto de enturbiamiento, por encima del cual decrece su afinidad por el agua y se produce una separación en dos fases, lo que perjudica la retirada de suciedad y su dispersión en el baño de lavado (von Rybinski, 2007).

1.4 Formulaciones detergentes

1.4.1 Composición

El RD 770/1999 por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes y limpiadores define un detergente como “todo producto cuya composición ha sido especialmente estudiada para colaborar al desarrollo de los fenómenos de detergencia y que se basa en componentes esenciales (agentes tensioactivos) y, generalmente, componentes complementarios (coadyuvantes, reforzantes, cargas, aditivos y otros componentes accesorios)”. El resultado final es un producto que además de producir una limpieza eficiente, ejerce un efecto de protección sobre las superficies a las cuales se aplica y proporciona al objeto lavado una serie de características deseadas. En España, además del mencionado RD 770/1999, la normativa aplicable a los ingredientes de formulaciones detergentes es la definida en el Reglamento (CE) n° 648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes, que establece normas destinadas a lograr la libre circulación de detergentes y tensioactivos para detergentes en la UE, garantizando al mismo tiempo una elevada protección del medio ambiente y de la salud humana.

Con el objetivo de favorecer el uso de productos con menor impacto ambiental, se estableció el Reglamento (CE) n° 1980/2000 que determina los requisitos necesarios para obtener la Etiqueta Ecológica. Dentro de los productos detergentes existen criterios ecológicos definidos para la concesión de la Etiqueta Ecológica a productos para lavavajillas, para lavado de ropa, para lavado de vajilla a mano, para productos de limpieza y para jabones y champús.

Los componentes que suelen formar parte de formulaciones detergentes son (Vincent, 2002):

Ácidos: Los ácidos minerales (fosfórico, nítrico, y en menor medida clorhídrico, sulfúrico y sulfámico) sirven esencialmente para disolver los depósitos minerales procedentes de los alimentos, del agua o de reacciones químicas agua-

alimentos. En algunos procesos de la industria alimentaria se originan residuos específicos como incrustaciones de cerveza con costras de proteínas, resinas de lúpulo u oxalato cálcico o incrustaciones lácteas que se forman sobre todo a partir del fosfato tricálcico (Kiermeier *et al.*, 2000). En procesos que utilizan aguas duras se forman en los equipos incrustaciones que tienen su origen en los cationes divalentes del agua. Todos estos depósitos requieren medios limpiadores ácidos. Su eficacia frente a incrustaciones minerales obedece a que transforman las sales originariamente insolubles en una forma hidrosoluble, como por ejemplo, en la reacción:



Bases: El hidróxido sódico es el principal componente de los detergentes alcalinos fuertes. Destruye numerosas suciedades grasas y proteicas por hidrólisis y peptización, respectivamente, y facilita su solubilización, siendo un componente principal en muchos sistemas de limpieza CIP (Schmidt, 1997). El hidróxido potásico tiene igual poder detergente, si bien se utiliza menos por su precio más elevado. No obstante, en algunos casos es preferible su uso ya que es más soluble en agua. Los detergentes moderadamente alcalinos contienen sales sódicas, potásicas o amónicas de fosfatos, silicatos o carbonatos. El fosfato trisódico (TSP) es uno de los ingredientes más antiguos y efectivos. Los silicatos se utilizan frecuentemente como inhibidores de corrosión.

Coadyuvantes de formulación o builders: Los builders tienen un papel central en el proceso de lavado. No sólo actúan secuestrando, intercambiando o precipitando los iones calcio y magnesio responsables de la dureza del agua, sino que refuerzan o mantienen la eficacia detergente de los tensioactivos proporcionando un pH alcalino, dispersando la suciedad e impidiendo su deposición (Schweiker, 1981). En la Tabla 1.1 se muestran las sales minerales tradicionalmente más utilizadas como builders y sus funciones.

Tabla 1.1. Builders y sus funciones (Vincent, 2002)

	Propiedades antical			Disper- sante de la suciedad	Emul- sionante de la suciedad	Anti redepo- sición	Anti- corrosión	Corrección de pH
	Por secuestro	Por inter- cambio iones	Por preci- pitación					
Fosfatos:								
Tripolifosfatos	X			X	X	X		X
Pirofosfatos			X	X				X
Ortofosfatos			X	X				
Zeolitas		X						
Citratos	X			X	X			X
Silicatos			X	X			X	X
Carbonatos			X					X

Durante mucho tiempo los más utilizados fueron los ortofosfatos pero han sido rápidamente sustituidos por los polifosfatos debido a sus excelentes propiedades detergentes y complejantes. El más utilizado es el tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) ya que permite disminuir la cantidad de agente de superficie a utilizar, mejora las propiedades de mojado del baño, la emulsificación y la dispersión de la suciedad. También evita la redeposición y controla la alcalinidad por su efecto tampón. El punto débil de los tripolifosfatos estriba en que en caliente sufren una hidrólisis que los transforma rápidamente en ortofosfatos.

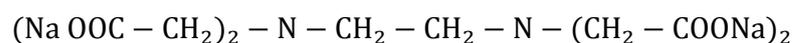
Los aluminosilicatos (zeolitas) son intercambiadores de iones insolubles en el agua capaces de fijar iones polivalentes. A 20 °C su capacidad de fijar los iones calcio es equivalente a la del tripolifosfato y es superior cuando se eleva la temperatura. Su utilidad en las formulaciones detergentes estriba en su capacidad de fijar también iones de metales pesados (Pb, Cu, Ag, Cd, Zn y Hg), lo cual es importante también desde el punto de vista medioambiental (Smulders y Sung, 2011).

Los citratos se utilizan como agentes complejantes de los iones calcio y magnesio, sobre todo como sustitutos del tripolifosfato en los detergentes líquidos, debido a su estabilidad a la hidrólisis en caliente. Por último, los carbonatos y los

silicatos (de sodio y potasio) se utilizan en formulaciones para limpieza de superficies delicadas (aluminio y aleaciones ligeras), pues las protegen del ataque alcalino.

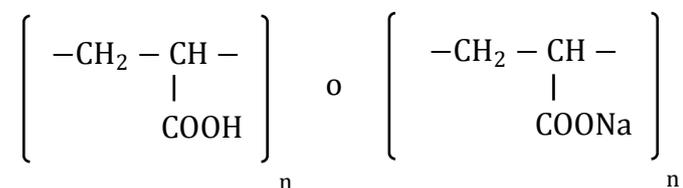
Además de las sales minerales, merecen destacarse otros coadyuvantes de origen orgánico:

- El ácido etilen diamino tetracético (EDTA) y sus sales alcalinas:



Estos compuestos tienen poder secuestrante y fijan los iones alcalino-térreos y los metales, evitando así su precipitación o deposición sobre las superficies. Para un metal dado, este agente secuestrante tendrá un intervalo de pH óptimo que se corresponde con un poder secuestrante máximo.

- Los ácidos poliacrílicos o poliacrilatos de sodio de fórmula:



De peso molecular 1500 a 4500, evitan la formación de depósitos de cal debidos a la dureza del agua o por la presencia de suciedad cálcica. Son eficaces en cantidades sub-estequiométricas (a diferencia del EDTA) y no actúan por efecto de secuestro sino por efecto de dispersión de las sales de calcio y de magnesio, también denominado *effect treshold* (Amjad y Hooley, 1994).

Agentes oxidantes: Se utilizan como reforzadores de detergencia por su acción oxidante no selectiva que ayuda a la destrucción de la suciedad difícil de eliminar, por ejemplo, aquella que no es modificada por efecto térmico. Los más utilizados son el hipoclorito de sodio, los compuestos orgánicos o minerales generadores de cloro, el perborato de sodio, los percarbonatos alcalinos y el agua oxigenada. El hipoclorito de sodio (NaOCl) es ampliamente utilizado debido a su compatibilidad química con la sosa, la potasa, el tripolifosfato, algunos dispersantes aniónicos y tensioactivos como los óxidos de aminas. Los perboratos son bien

conocidos en los detergentes domésticos en polvo, siendo compatibles con la mayor parte de los compuestos tradicionales.

Disolventes: Los más utilizados son los glicoles o ésteres de glicol que, además de algunas propiedades desinfectantes, presentan propiedades de solubilización interesantes para el formulador cuando se trata de acoplar productos de tendencia lipófila en un medio hidrófilo. También se utilizan alcoholes de bajo peso molecular (etanol, 2-propanol, glicerol) (Smulders y Sung, 2011).

Por su especial importancia, las características que poseen los tensioactivos y enzimas como componentes de formulaciones detergentes se describen en capítulos aparte.

1.4.2 Uso de los tensioactivos en detergentes

El Reglamento (CE) nº 648/2004 define tensioactivo como “toda sustancia orgánica o preparado utilizado en los detergentes que tiene propiedades tensioactivas y que consta de uno o varios grupos hidrófilos y de uno o varios grupos hidrófobos cuyas características y tamaño permiten la disminución de la tensión superficial del agua, la formación de monocapas de esparcimiento o de adsorción en la interfase agua/aire, la formación de emulsiones y/o microemulsiones o micelas y la adsorción en la interfase agua/sólido”. Estas propiedades se deben a su naturaleza anfifílica: constan de dos partes estructurales o grupos bien diferenciados, un grupo hidrofílico (grupo cabeza) y una cadena hidrocarbonada (cola hidrofóbica). Para que un compuesto anfifílico tenga carácter tensioactivo debe tener un equilibrio entre carácter hidrófilo y lipófilo. Por ello la longitud de cadena hidrocarbonada de los tensioactivos habituales oscila aproximadamente entre C₈ y C₁₈ (Kiermeier *et al.*, 2000).

La proporción de los grupos hidrófilos en la totalidad de la masa molar sirve frecuentemente para expresar las propiedades anfifílicas de un tensioactivo mediante el índice HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*, o *Balance Hidrófilo-Lipófilo*). De aquí resulta una escala de valores entre 0 y 20. Los tensioactivos con valores de HLB menores que 10 son preferentemente liposolubles y aquellos con valores mayores que 10 son generalmente hidrosolubles.

Mientras que el grupo hidrófilo desarrolla una fuerte acción mutua con las moléculas de agua que le rodean, esta acción es mucho menos marcada en la cadena hidrófoba. Debido a esto, esta última se separa mientras que el grupo hidrófilo permanece disuelto en el agua. Como resultado de esta conducta opuesta de ambas zonas de la molécula de tensioactivo, los grupos se orientan preferentemente en las superficies de separación agua/aire (Figura 1.8).

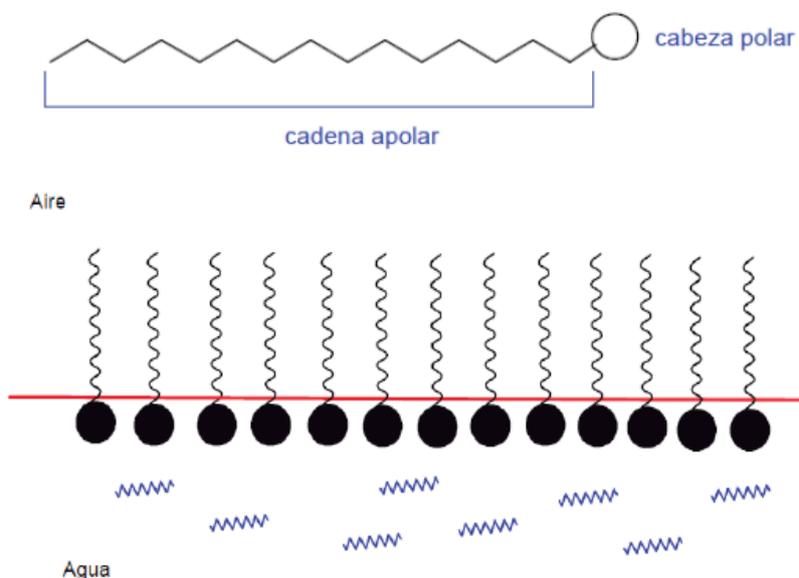


Figura 1.8. Estructura de un tensioactivo y orientación en la interfase agua/aire

Con ayuda de tensioactivos ordinarios puede reducirse la tensión superficial del agua desde 72 mN/m (valor a temperatura ambiente) a 30 mN/m. Esto permite que las soluciones limpiadoras puedan penetrar en rendijas estrechas y eliminar de allí posibles residuos de alimentos.

La tensión superficial de una solución acuosa de tensioactivo va disminuyendo a medida que aumenta la concentración hasta alcanzar un valor mínimo. La concentración de tensioactivo que presenta la mínima tensión superficial se denomina concentración micelar crítica (CMC) y equivale a aquella en la que se forman las micelas (agregados en los que las moléculas de tensioactivo se orientan con la cadena lipófila dirigida hacia el interior y las cabezas apolares hacia el exterior (Figura 1.9)). Cada tensioactivo tiene una CMC característica para cada temperatura y concentración de electrolitos en disolución. En general, para un determinado tipo de tensioactivo la CMC desciende con el aumento de longitud del grupo hidrofóbico (cadena alquílica) (Tadros, 2005).

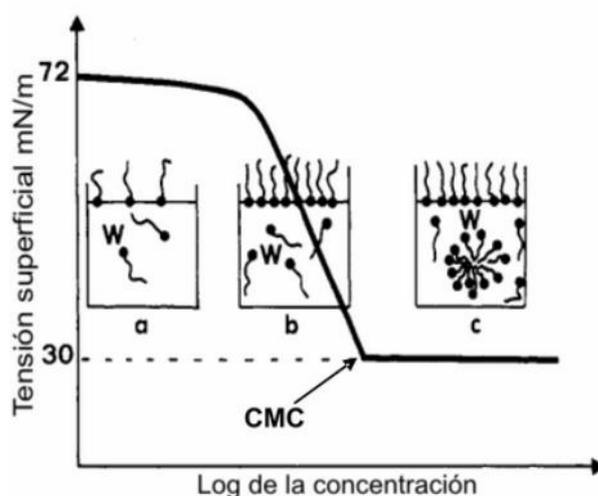


Figura 1.9. Evolución de la tensión superficial con la concentración de tensioactivo y formación de micelas

La clasificación más general y utilizada para los tensioactivos atiende al carácter iónico del grupo hidrófilo que contienen, distinguiéndose entre tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos. A continuación se describen sus principales características, en orden de importancia según volumen de producción y consumo a nivel mundial (Kosswig, 2011). En cada capítulo se prestará especial atención a los tensioactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo.

1.4.2.1 Aniónicos

Son los tensioactivos más utilizados en aplicaciones industriales debido a sus costes de fabricación relativamente bajos. Poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga negativa, siendo los responsables de la actividad superficial. La detergencia óptima se alcanza cuando la cadena hidrófoba es un grupo alquilo lineal con una extensión de 12-16 átomos de carbono, con preferencia de las cadenas lineales sobre las ramificadas por su mayor efectividad y biodegradabilidad (Tadros, 2005). Los grupos hidrofílicos más comunes son carboxilatos, sulfatos, sulfonatos y fosfatos.

Estos tensioactivos pueden mostrar una fuerte sensibilidad a la dureza del agua. Para evitar la precipitación en aguas duras se suelen modificar introduciendo

cadenas hidrófilas de óxido de etileno, lo que incrementa su solubilidad en agua y su estabilidad química.

Los tensioactivos aniónicos comerciales más utilizados son los lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS), alquiletoxisulfatos (AES) y alquilsulfatos (AS) (Ying, 2006). Los tradicionales jabones (sales de ácidos grasos) siguen siendo los tensioactivos más utilizados en países en vías de desarrollo (Smulders y Sung, 2011). En esta Tesis Doctoral se han utilizado los tensioactivos aniónicos LAS y ECA(derivados de ácidos alquil éter carboxílicos).

Los **lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS)** son los tensioactivos aniónicos más utilizados a nivel mundial. Son producto de la sulfonación y posterior neutralización del alquilbenceno lineal, siendo la sal sódica la utilizada con más frecuencia. El enlace directo C-S otorga a los sulfonatos gran estabilidad frente a la hidrólisis.

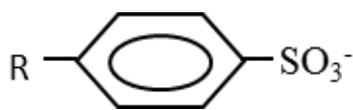
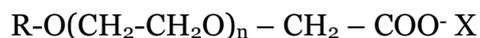


Figura 1.10. Fórmula estructural del LAS

Los octil a decilbenceno sulfonatos tienen una buena mojabilidad pero no son adecuados como emulsificantes o agentes de limpieza debido a la escasa longitud de su grupo hidrofóbico. Los LAS más utilizados son aquellos que poseen una cadena hidrofóbica media de 12 átomos de carbono, conteniendo homólogos con 10-14 átomos de carbono (dodecilbenceno sulfonato) (Kosswig, 2011). Estos tensioactivos son constituyentes habituales de detergentes domésticos e industriales, tanto líquidos como en polvo. Otro factor a su favor es su fácil degradabilidad en condiciones aerobias y bajo riesgo sobre los ecosistemas acuáticos (Sanderson *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2013).

La creciente preocupación sobre la biodegradabilidad y toxicidad de los tensioactivos comerciales ha promovido el desarrollo de nuevos productos con mejor comportamiento ambiental (Yu *et al.*, 2008). Entre ellos se encuentran los **derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (ECA)**. Su fórmula general es



donde R es la cadena alquílica y X = H⁺ o Na⁺. Los ECA con longitud de cadena hidrófoba de 4 a 8 átomos de carbono son tensioactivos de bajo nivel espumante y con propiedades dispersantes. En cambio, los ECA con longitud de cadena alquílica entre 12 y 14 átomos de carbono se caracterizan por sus buenas propiedades espumantes a diferentes pH. Ambas categorías se pueden usar en formulaciones detergentes con una elevada concentración de electrolitos y coadyuvantes. También destacan por reducir el nivel de irritación en la piel, por lo que son empleados como co-tensioactivos en formulaciones detergentes que van a estar en contacto con la piel. Su comportamiento ambiental ha sido estudiado por Jurado *et al.* (2012b).

1.4.2.2 No iónicos

Los tensioactivos no iónicos son compuestos que no dan lugar a iones en disolución acuosa. Su carácter hidrófilo proviene de la hidratación de los grupos polares presentes en la molécula, siendo su solubilidad función de la relación existente entre el número de grupos hidrófilos e hidrófobos. Los más corrientes están constituidos por un grupo hidrófilo, formado por un condensado de varias moléculas de óxido de etileno sobre un radical hidrófobo que es a menudo un alcohol graso, un alquilfenol, un ácido graso o una amina. Los más importantes desde un punto de vista comercial son los alquilfenol etoxilados (APE) y los alcoholes etoxilados (AE) (Ying, 2006). Por otra parte, el aumento del interés por el uso de recursos renovables para la fabricación de tensioactivos ha dado lugar al desarrollo de productos basados en carbohidratos y aceites vegetales. Entre estos productos cabe destacar los alquilpoliglucósidos (APG) y los éster de glicerina polietoxilados (PGE).

Los tensioactivos no iónicos tienen numerosas aplicaciones destacando por ser buenos agentes humectantes y emulsionantes y con un poder espumante reducido, siendo compatibles con todos los tipos de tensioactivos. Además, sus propiedades pueden ser ajustadas cambiando la longitud de la fracción etoxilada (St. Laurent *et al.*, 2007), siendo menos sensibles que los tensioactivos aniónicos a la dureza del agua. Sin embargo, contrariamente a ellos, la solubilidad de los tensioactivos no iónicos disminuye cuando aumenta la temperatura. Mientras que en frío forman soluciones limpias, éstas se enturbian a partir de cierta temperatura denominada

“punto de enturbiamiento” (*cloud point*). Esto se debe a la ruptura por calentamiento de los enlaces de hidrógeno formados entre el agua y los átomos de oxígeno de las moléculas de óxido de etileno. Esto da lugar a la turbidez y la separación de una fase de tensioactivo que se vuelve inmiscible en agua (Kosswig, 2011). El punto de enturbiamiento es importante ya que en las cercanías de dicho punto se consiguen las propiedades detergentes óptimas y las condiciones espumantes mínimas (Vincent, 2002; Smulders y Sung, 2011). Este punto generalmente disminuye al aumentar la concentración de tensioactivo.

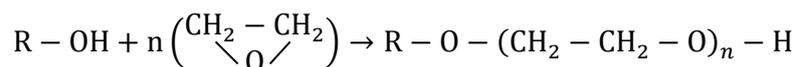
En este trabajo se han utilizado varios tipos de tensioactivos no iónicos: alcoholes etoxilados, alquilpoliglucósidos y ésteres de glicerina polietoxilados.

Los **alcoholes etoxilados (AE)** son los tensioactivos no iónicos más utilizados, y los segundos más consumidos después del LAS (Tabla 1.2). En 2012, el 60% de los AE producidos en la UE se obtuvieron de materias primas renovables (CESIO, 2012). Están presentes en mayor o menor medida en prácticamente todas las formulaciones detergentes actuales, tanto domésticas como industriales. Esto se debe a sus excelentes propiedades de lavado, buen precio, proceso de fabricación sencillo, capacidad de estabilización de enzimas y su buena capacidad para solubilizar las suciedades oleosas.

Tabla 1.2. Consumo mundial de los grupos de tensioactivos de mayor importancia (kt) (Álvarez, 2004)

Tensioactivo	1988	1992	1995	2000	2005
Sulfonato de alquilbenceno lineal – LAS	2.113	2.468	2.791	3.304	3.883
Sulfonato de alquilbenceno ramificado	524	430	261	175	142
Derivados de alcoholes	1.448	1.764	2.092	2.580	3.100
Alcoholes Etoxilados – AE	692	746	836	1029	1.256
Sulfatos de alcoholes etoxilados - AES	485	542	666	794	952
Sulfatos de alcoholes grasos – PAS	271	475	589	756	891
Alquilfenoles etoxilados – APE	590	642	660	714	773
Sulfonatos de alfa olefinas y parafinas - AOS	140	140	130	150	160

Se obtienen a partir de alcoholes derivados del aceite de coco, de sebo o bien son sintetizados a partir de una cadena lineal a la que se añade un número determinado de moles de óxido de etileno (etoxilación). Su fórmula es:



Las propiedades de estos tensioactivos varían según el número de unidades etoxi y el número de átomos de carbono de la cadena hidrófoba. Los productos comerciales poseen en general cadenas alquílicas C₁₂-C₁₅. El número de unidades de óxido de etileno promedio es del orden de 6 a 10 para detergentes, y de más de 10 para dispersantes de jabones de calcio o detergentes muy hidrofílicos y humectantes (Fernández *et al.*, 2004). Los alcoholes etoxilados de bajo peso molecular (C₁₀ a C₁₄) poseen menos poder espumante que los alcoholes de C₁₆ a C₂₀, y por ello se usan en detergentes para el lavado de ropa o vajilla.

Los alcoholes etoxilados constituyen una alternativa más respetuosa con el medio ambiente que los alquilfenol etoxilados (APE) (Scott y Jones, 2000). Presentan una alta biodegradabilidad en condiciones aeróbicas, superior a la de muchos tensioactivos comerciales, con independencia del tamaño de cadena carbonada y del grado de etoxilación (Jurado *et al.*, 2013). Bajo condiciones anaerobias, la biodegradación de los AE presenta comportamientos diferenciados en función del número de moles de óxido de etileno y del tamaño de la cadena carbonada (Mezzanotte *et al.*, 2002). Una completa evaluación de su riesgo ambiental se puede encontrar en HERA (2009).

Es importante indicar la capacidad que tienen los AE para interactuar con otros tensioactivos en los detergentes comerciales. Aronson *et al.* (1983) encontraron una interacción negativa entre varios AE y el tensioactivo iónico LAS, de tal modo que la presencia de LAS podía inhibir la eficacia de lavado de suciedades grasas por parte de los tensioactivos no iónicos. Además la presencia de un tensioactivo iónico, incluso en pequeñas cantidades, puede elevar el punto de enturbiamiento de la solución de forma más o menos significativa dependiendo del tensioactivo no iónico que se utilice como base (Smulders y Sung, 2011).

En la actualidad, la preocupación por el medio ambiente y la presión legislativa ha impulsado la sustitución parcial de los tensioactivos basados en derivados petroquímicos por aquellos cuyas materias primas proceden de recursos renovables. Es el caso de los **alquilpoliglucósidos (APG)**, que se obtienen por glicosilación a partir de glucosa y alcoholes grasos generalmente procedentes del almidón de maíz

y de aceites de coco y palma, respectivamente. Como resultado de los procesos industriales de fabricación se obtienen mezclas de mono, di, tri y oligoglucósidos en función de los parámetros de reacción. Así, para formulaciones detergentes suelen emplearse aquellos APG con una cadena alquílica de C_{12} - C_{14} y un grado de polimerización cercano a 1.42 (von Rybinski y Hill, 1998).

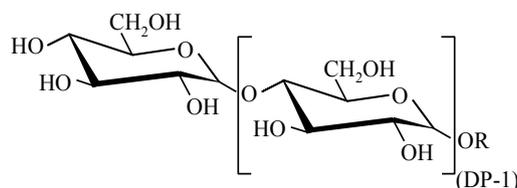


Figura 1.11. Fórmula estructural de los APG

Los APG se utilizan en una gran variedad de productos detergentes tanto de uso doméstico como industrial. Además, su suavidad y compatibilidad con la piel los hacen aptos para todo tipo de productos de cuidado personal. En estas formulaciones los APG se suelen incluir como cosurfactantes en unión con un tensioactivo primario de forma que complementan o mejoran cuantitativamente la eficacia de lavado de éste. Su amplio uso como tensioactivo secundario se debe a sus pronunciados efectos sinérgicos con tensioactivos aniónicos como los lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS), sulfonatos de alcanos secundarios (SAS) y sulfatos de alcoholes grasos (PAS) (von Rybinski y Hill, 1998; Mirajkar, Y.-R.K., 2009; Kosswig, 2011). Estas interacciones sinérgicas permiten la formulación de productos aún más eficaces a partir de la misma cantidad de materia activa o incluso reduciendo su concentración.

La longitud de la cadena alquílica influye en las propiedades físicas de los APG. Mientras que una menor longitud de cadena conlleva una mejora de la mojabilidad, el poder emulsificante y la reducción en la tensión superficial aumenta cuando lo hace la longitud de la cadena carbonada (Ware *et al.*, 2007). Otro punto a destacar es que la adición de APG a las formulaciones detergentes mejora la estabilidad de las enzimas (proteasas, amilasas, lipasas y celulasas) durante el periodo de almacenamiento del producto (Hill *et al.*, 1997; Mirajkar, Y.-R.K., 2009).

En cuanto a las propiedades ecológicas de los APG, diversos estudios han comprobado su alta biodegradabilidad así como su baja toxicidad acuática (García *et al.*, 1997; Holmberg, 2001). La biodegradación de estos tensioactivos ocurre

mediante una escisión central en la molécula, obteniéndose alcoholes y polisacáridos. Por otra parte, su biodegradabilidad baja cuando las cadenas hidrófobas son largas o poseen alto número de grupos hidrófilos (Qin *et al.*, 2006). Los homólogos de APGs con cadenas alquílicas más largas presentan mayores valores de ecotoxicidad (Uppgard *et al.*, 2000).

Por último, los ésteres de mono y poliglicerol han demostrado ser tensioactivos eficaces (Johansson y Svensson, 2001). Como consecuencia de sus propiedades multifuncionales y su naturaleza inocua, son ampliamente utilizados en muchas aplicaciones en la industria cosmética. Su función es notable como emulsificantes, dispersantes, espesantes y solubilizantes (Plasman *et al.*, 2005). Concretamente la familia de tensioactivos utilizada en este trabajo, los **ésteres de glicerina polietoxilados (PGE)**, se obtienen a partir de la reacción de glicerina, óxido de etileno y ácidos grasos procedentes del aceite de coco. La combinación de estos tres componentes proporciona una amplia gama de productos con diferentes aplicaciones en cuanto a apariencia, capacidad espumante, espesante y emulsificante, así como efectos acondicionadores o hidratantes. Dentro de esta familia de tensioactivos, cuanto mayor es el grado de etoxilación las propiedades espumantes y espesantes empeoran, si bien aumenta su poder dispersante y su solubilidad en grasas.

Los ésteres de glicerina polietoxilados (PGE) se caracterizan también por presentar ventajas ecológicas y toxicológicas cuando se comparan con otros tensioactivos no iónicos. Son idóneos para formulaciones detergentes “ecofriendly”, que presentan la mejor clasificación de acuerdo con la Directiva Europea 1999/45/EC de clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos. Además de las ventajas mencionadas, en la actualidad existe un creciente interés en estos tensioactivos debido a la necesidad de aprovechamiento del exceso de glicerina procedente de la industria de fabricación de biodiesel (Martínez *et al.*, 2011).

1.4.2.3 Catiónicos

En estos compuestos la parte de la molécula responsable de los fenómenos de superficie está cargada positivamente. Están constituidos por uno o varios grupos hidrófobos (cadenas alquílicas) unidos a un átomo de nitrógeno cuaternario hidrófilo que confiere un carácter positivo. Su fórmula general será por tanto

$R^1R^2R^3R^4N^+X^-$, donde X^- es un ión del tipo halógeno y R representa los grupos alquilo (sales de amonio cuaternarias). La alquilación también se puede dar sobre átomos de nitrógeno de heterociclos como por ejemplo la piridina (Vincent, 2002). También puede contener alguna cadena de óxidos de etileno dando lugar a las sales de amonio polietoxiladas.

Debido a su carga positiva estos tensioactivos se adhieren o adsorben fácilmente en la mayoría de las superficies sólidas, generalmente cargadas negativamente. Debido a su incompatibilidad con los productos aniónicos son poco utilizados en los productos de limpieza. Sin embargo sí son parte habitual de suavizantes textiles y acondicionadores capilares. Son buenos bactericidas si se incorporan como principios activos en formulaciones desinfectantes (Tatsumi *et al.*, 2001; Kosswig, 2011). En general, las sales de amonio cuaternarias son consideradas biológicamente degradables bajo condiciones aerobias (Ying, 2006). Aunque pocos son los estudios que se han llevado a cabo sobre la biodegradabilidad de tensioactivos catiónicos en condiciones anaerobias, se considera que las sales de alquil trimetil amonio, y en general, los tensioactivos catiónicos no son anaeróbicamente biodegradables (Sibila, 2008). Además son tóxicos incluso a bajas concentraciones (Scott y Jones, 2000).

1.4.2.4 Anfotéricos

Los tensioactivos anfotéricos muestran un comportamiento aniónico en medio alcalino y catiónico en medio ácido. Existe un pH en el que la polaridad catiónica iguala a la polaridad aniónica, denominado punto isoeléctrico. Este punto marca el cambio en las propiedades del tensioactivo, presentando un mínimo en la solubilidad en agua y un máximo de actividad superficial (Tadros, 2005). Los tensoactivos más utilizados en esta familia son las n-alquil betaínas (como la cocamidopropil betaína, CAPB) y los ácidos alquilaminocarboxílicos.

Por su naturaleza muestran una excelente compatibilidad con otros tensioactivos, formando micelas mixtas con ellos. También presentan excelentes propiedades dermatológicas por lo que son utilizados habitualmente como tensioactivos secundarios en productos de carácter cosmético. En estos productos la combinación de tensioactivos primarios aniónicos con tensioactivos anfotéricos

reduce la irritación en la piel y en membranas mucosas, espesa el producto y ayuda a la producción de una espuma más agradable (Leidreiter *et al.*, 1997).

1.4.3 Uso de enzimas en formulaciones detergentes

El uso de enzimas en formulaciones detergentes representa la mayor aplicación de las enzimas a nivel industrial, tanto en términos de volumen como de valor económico (Pongsawasdi y Murakami, 2010). Tanto en detergentes para lavado textil como para lavado de vajillas o para uso industrial e institucional (I&I) las enzimas contribuyen a acortar los tiempos de lavado, reduciendo el consumo de agua y energía y permitiendo el descenso de la temperatura de trabajo. Además, generan efluentes más respetuosos con el medio ambiente y permiten reducirlos valores de pH en la solución de lavado (Olsen y Falholt, 1998). Los últimos avances en ingeniería genética y de proteínas han contribuido a mejoras en la estabilidad, economía, especificidad y eficacia en general de las enzimas industriales.

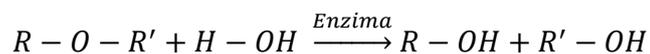
En la industria alimentaria las proteasas se han utilizado durante años como componentes minoritarios de las formulaciones detergentes empleadas en la limpieza de plantas de ósmosis inversa. Actualmente también se usan para la limpieza de procesos de micro- y ultrafiltración empleados en la industria cervecera, láctea y de zumos. También se incorporan enzimas en detergentes utilizados en sistemas de limpieza *cleaning-in-place* (CIP) empleados en la industria láctea para la limpieza de módulos de ultrafiltración y para equipos de intercambio de calor (Olsen y Falholt, 1998). Más recientemente se ha estudiado la eficacia de las enzimas para la eliminación de biopelículas en la industria alimentaria, cuya formación puede ocasionar graves problemas de contaminación. Las biopelículas son asociaciones de microorganismos unidas por una matriz polimérica extracelular y adheridas como una capa a superficies duras como depósitos o tuberías (Varzakas, 2015). Pueden ser resistentes a los tratamientos físicos y químicos habituales en los procesos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria (Chmielewski y Frank, 2003). Lequette *et al.* (2010) han estudiado la acción de proteasas y amilasas como parte de soluciones de limpieza en sistemas CIP, concluyendo que dichas enzimas atacan a los principales componentes de la matriz de las biopelículas, favoreciendo su degradación e incrementando la acción de las soluciones detergentes habituales compuestas principalmente por NaOH y tensioactivos.

Casi todas las enzimas usadas en la actualidad son hidrolasas, es decir, enzimas que degradan a sus sustratos por hidrólisis utilizando el agua como co-sustrato. Las tres principales hidrolasas utilizadas en detergentes son las proteasas, lipasas y carbohidrasas. Desde hace más de 40 años, las proteasas se añaden a los detergentes para eliminar manchas recalcitrantes de sustancias con alto contenido proteico, como la sangre o el huevo. Son las más utilizadas en detergentes representando un 60% del mercado global de enzimas para estas aplicaciones (Zhang *et al.*, 2014). Las carbohidrasas son el segundo grupo por importancia. Incluye a las amilasas, celulasas y mananasas y se utilizan para hidrolizar diversos tipos de carbohidratos presentes en la suciedad. Por último, para la eliminación de grasas y aceites se utilizan las lipasas, si bien su importancia en la industria de los detergentes es menor.

Dentro de las carbohidrasas, la celulasa hidroliza la celulosa presente en manchas de hierba, pero se utiliza principalmente en detergentes para textiles por mantener la calidad de los tejidos mediante reacciones selectivas. La carbohidrasa de incorporación más reciente a las formulaciones detergentes es la mananasa que degrada el galactomanano, un componente de la goma guar usado cada vez más en alimentación y productos cosméticos y del hogar (Wolfgang, 2004). Pero sin duda la carbohidrasa más empleada en detergentes, y la enzima más utilizada tras las proteasas, es la α -amilasa, que degrada específicamente el almidón contenido en multitud de productos alimenticios.

1.4.3.1 α -amilasas

La α -amilasa es una glucosil hidrolasa cuya acción sobre las cadenas de almidón se puede representar como:



donde R y R' son cadenas que contienen de 1 a n moléculas de glucosa anhidra. La reacción de hidrólisis enzimática del almidón es un proceso complejo. Como el almidón se compone de dos polímeros (amilosa y amilopectina) cuenta con una estructura complicada donde existen ramificaciones y diferentes tipos de enlaces, α -1,4 y α -1,6, que son hidrolizados por diferentes enzimas. Los productos de reacción

variarán en función del tipo de enzima utilizada y el tiempo de hidrólisis y estará formada por sacáridos de diferentes pesos moleculares.

Las α -amilasas (α -1,4-D-glucano glucanohidrolasas, 3.2.1.1) hidrolizan el almidón atacando los enlaces glicosídicos α -1,4 de forma aleatoria (se clasifican como endoenzimas). Como resultado se obtienen oligosacáridos de diversa longitud y dextrinas (Gupta *et al.*, 2003). Habitualmente esta hidrólisis primaria es suficiente para la eliminación eficiente del almidón adherido a superficies duras (Herbots *et al.*, 2011). Tanaka y Hoshino (1999) encontraron que la eficacia de diferentes α -amilasas para la eliminación de suciedades amiláceas depende principalmente de la hidrólisis de la amilopectina que conduce a la reducción del grado de polimerización y a la licuefacción del polímero. El almidón se degrada lentamente por las α -amilasas en su estado nativo pero es altamente susceptible al ataque enzimático tras su hinchamiento y gelatinización en agua (Olsen y Falholt, 1998). Debido a que el almidón contenido en la mayoría de alimentos ha sufrido en mayor o menor grado gelatinización debida a los procesos de elaboración, las α -amilasas facilitan el lavado de suciedades amiláceas alimentarias (pasta, patata, sopas, chocolates, salsas o alimentación infantil).

Estas enzimas también previenen la adhesión del almidón hinchado sobre los tejidos y superficies duras, evitando que éste actúe como pegamento para la adhesión de otras partículas sólidas, lo que origina depósitos aún más difíciles de eliminar que los compuestos únicamente de almidón. Además, las α -amilasas ayudan a evitar el pardeamiento de los tejidos, pues éste resulta de la combinación de los depósitos amiláceos con otras partículas de suciedad presentes (Pongsawasdi y Murakami, 2010).

Las α -amilasas utilizadas en detergentes son de origen bacteriano y se producen por fermentación a partir de cultivos de *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Licheniformis* y *Bacillus Amyloliquefaciens*. Sin embargo, las amilasas así producidas se ven afectadas por ciertos componentes de los detergentes, como lejías u oxidantes. Es por ello que en la actualidad se utiliza la ingeniería genética y de proteínas para obtener amilasas genéticamente modificadas más estables, resistentes y capaces de trabajar en condiciones más favorables para la detergencia, como son temperaturas bajas y ambientes alcalinos (Pongsawasdi y Murakami, 2010, Herbots *et al.*, 2011).

El grado de eficacia de las enzimas en formulaciones de limpieza depende por tanto de múltiples factores: la composición y formato del detergente (líquido o en polvo), la temperatura y pH de la solución de lavado, el tiempo de duración del proceso, la carga de suciedad y sus características, etc. Los componentes de la solución detergente pueden causar efectos sinérgicos. Diversos autores han reportado sinergias en la eficacia de lavado de suciedades alimentarias cuando se utilizan mezclas de enzimas, especialmente proteasas y amilasas (Olsen y Falholt, 1998; Hmidet *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

Por otra parte, los tensioactivos sintéticos interaccionan con las enzimas en soluciones acuosas, pudiendo ocasionar gran variedad de efectos en la actividad enzimática (Montserret *et al.*, 2000; Hagihara *et al.*, 2002; Lundqvist *et al.*, 2002a; Lundqvist *et al.*, 2002b; Lundqvist *et al.*, 2002c; Tanaka y Hoshino, 2002; Russell y Britton, 2002). Es conocido que la formación de micelas de tensioactivos aniónicos y catiónicos puede alterar la conformación de las proteínas debido a fuertes interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Hagihara *et al.*, 2002; Lundqvist *et al.*, 2002a). Se ha demostrado que la velocidad de hidrólisis de la amilosa por α -amilasas de *B. Amyloliquefaciens* y *B. Licheniformis* varía en presencia del tensioactivo aniónico SDS (dodecilsulfato sódico). También se sabe que la velocidad de reacción aumenta a concentraciones inferiores a su CMC y disminuye por encima de este valor (Tanaka y Hoshino, 2002; Hoshino y Tanaka, 2003). Por otra parte, el tensioactivo catiónico DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio) incrementa la actividad de la α -amilasa a bajas concentraciones. Sin embargo, a concentraciones elevadas la interacción con el tensioactivo altera la estructura enzimática y se pierde actividad (Yan *et al.*, 2009). Otros resultados, sin embargo, indican que tanto la actividad de la α -amilasa como la velocidad de hidrólisis aumenta con la concentración de los tensioactivos SDS y CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) incluso a valores muy por encima de su CMC (Antony *et al.*, 2014). Los autores indican que el ambiente polar generado por los tensioactivos iónicos en la fase micelar refuerza la formación del complejo enzima-sustrato. Sin embargo este efecto se observa a bajas temperaturas (30 °C). El aumento de temperatura desestabiliza la interacción enzima-tensioactivo y la actividad desciende a valores similares a los obtenidos en ausencia de tensioactivos. En los últimos años varios autores han obtenido α -amilasas a partir de diversas cepas bacterianas y han demostrado su estabilidad frente a los principales componentes de las formulaciones detergentes

comerciales, entre ellos los tensioactivos aniónicos (Mitidieri *et al.*, 2006; Hmidet *et al.*, 2009; Jaiswal y Prakash, 2011; Roy *et al.*, 2012; Roy y Mukherjee, 2013).

Los tensioactivos no iónicos no alteran la conformación de las proteínas puesto que no provocan efectos electrostáticos (Hagihara *et al.*, 2002; Russell y Britton, 2002). Su uso en formulaciones detergentes, por tanto, es perfectamente compatible con la adición de enzimas. En este sentido, von Rybinski y Hill(1998) señalaron la capacidad de los alquilpoliglucósidos (APGs) para aumentar la estabilidad de las enzimas en formulaciones detergentes líquidas, impidiendo la pérdida de actividad durante su almacenamiento. Por su parte, Russell y Britton(2002) indicaron que la presencia de alcoholes etoxilados (AEs) estabilizaban proteasas en presencia de tensioactivos aniónicos como el LAS, impidiendo la pérdida de actividad enzimática que pueden ocasionar. Algunos tensioactivos no iónicos han aumentado la actividad catalítica de enzimas como indica Hoshino y Tanaka(2003), que obtuvieron un aumento de la velocidad de hidrólisis de amilopectina con una α -amilasa de *B. Amyloliqefaciens* a concentraciones de polioxietilen mono-N-dodecil éter (Brij 35) superiores a su CMC. Comprobaron que la amilopectina se ligaba al tensioactivo y que la enzima se unía a sus micelas, de tal modo que la catálisis era más eficiente en la pseudofase micelar que en la fase acuosa.

1.4.4 Micropartículas y nanopartículas en detergentes

De igual manera que los tensioactivos, las partículas de tamaño coloidal (desde 1 nm hasta varias decenas de micrometros) pueden acumularse espontáneamente en las interfases líquido-gas o líquido-líquido y actuar así como estabilizantes de emulsiones y espumas (Binks, 2002; Hunter *et al.*, 2008; Eskandar *et al.*, 2011). Una gran variedad de materiales tanto orgánicos (nanopartículas de lípidos sólidos) como inorgánicos (sílice, arcilla, óxido férrico, dióxido de titanio, alúmina, carbón o látex) se utilizan como estabilizantes de emulsiones oleosas en agua o de agua en aceite, encontrando numerosas aplicaciones en la producción de alimentos y bebidas, productos de cuidado personal, textiles, fármacos y en el mercado de los detergentes.

Las partículas coloidales actúan en gran medida como las moléculas de tensioactivo, particularmente si se adsorben en una interfase fluido-fluido. Al igual

que la afinidad de un tensioactivo por la fase acuosa o grasa se cuantifica en términos de su balance hidrófilo-lipófilo (HLB), para una partícula esférica esta tendencia se describe por medio de su mojabilidad, dada por su ángulo de contacto en la región en la que coinciden las tres fases (Binks, 2002). A diferencia de los tensioactivos, que estabilizan las emulsiones por medio de la reducción de la tensión interfacial, las partículas aportan estabilidad proporcionando una barrera estérica en la interfase y modificando las propiedades reológicas de las emulsiones (Aveyard *et al.*, 2003). Por otra parte, puesto que las partículas individuales no se organizan para formar agregados en la forma en que los tensioactivos forman micelas, las partículas coloidales no participan en fenómenos de solubilización. Sin embargo, las micropartículas sí que pueden contribuir a la limpieza de superficies por su efecto abrasivo (Pérez-Prat *et al.*, 2013).

Las propiedades estabilizadoras de las micro- y nanopartículas permiten la producción de emulsiones y espumas estables sin necesidad de utilizar tensioactivos (Stiller *et al.*, 2004; Binks y Horozov, 2005), pero si se añaden a éstos pueden obtenerse efectos sinérgicos. Así, Eskandar *et al.* (2011) encontraron sinergias entre dos tensioactivos convencionales y nanopartículas de sílice hidrófila cuando se evaluó la estabilidad de emulsiones de aceites en agua. La estabilidad se incrementó especialmente con los aceites polares mientras que el efecto fue menor cuando se utilizó parafina líquida no polar. Por su parte, Atta y Al-Lohedan (2014) produjeron un biosurfactante a base de resina vegetal y encontraron que el incremento de su concentración en presencia de sílice hidrofóbica mejoraba la estabilidad de la emulsión tolueno/agua.

Estas propiedades de las micro- y nanopartículas han llevado a la elaboración de estudios orientados a su aplicación en la retirada de suciedad y contaminantes de agua residual (Zhang *et al.*, 2006) o de diferentes sustratos (Chengara *et al.*, 2004; da Silveira, 1997; Wasan y Nikolov, 2003). En particular, se han llevado a cabo trabajos que estudian la retirada de depósitos de almidón con ayuda de nanopartículas. Lee *et al.* (2009a) estudiaron nanopartículas de sílice y laponita para aplicaciones detergentes con el fin de aumentar la eficacia de lavado y reemplazar a los tensioactivos en dichas aplicaciones, observando que la adición simultánea de nanopartículas y enzima sobre depósitos de almidón aumenta la eficacia de la enzima en la retirada de almidón. Por otra parte, Soleimani *et al.* (2012) utilizaron α -amilasa inmovilizada en nanopartículas de sílice para la

formulación de un detergente en polvo para lavado de manchas de almidón sobre textiles. Los resultados mostraron que la eficacia de lavado de la enzima inmovilizada era mucho mayor que la de la enzima libre. Además, el proceso de inmovilización en las partículas de sílice reducía la sensibilidad de la enzima a algunos ingredientes del detergente, así como aumentaba su estabilidad durante el almacenamiento y vida útil del producto. Recientemente Khanmohammadi *et al.*(2015) evaluaron la eficacia de diversas formulaciones detergentes en polvo conteniendo nanoalúmina.

Las especiales propiedades de las partículas coloidales (micro- y nanopartículas) y las ventajas que ofrecen en los procesos asociados con la detergencia han conducido a su utilización cada vez mayor en productos detergentes para muy diversos usos. En la Tabla 1.3 se muestran ejemplos de patentes de formulaciones de lavado que contienen micropartículas (MP) o nanopartículas (NP) de diverso origen.

Tabla 1.3. Patentes de productos detergentes con micropartículas y/o nanopartículas

Número	Año	Título	Inventores/ Solicitante	Partículas utilizadas
US4720351A	1988	Multi functional laundry product and employment of the same during fabric laundering	Flynn, B.P., Winetzky, D.S., Evans, G.D. / Purex Corporation (EEUU)	MP de sílice
US5834414A	1998	Detergent composition having improved chlorine stability characteristics, novel chlorine containing format and method of making chlorine stable composition	Sowle, E.D., Bowling, D.C. / Ecolab Inc (EEUU).	NP de sílice
WO2004104153 A1	2004	Manufacturing method of liquid laundry detergent with nano-sized silver colloid	Kyoung-Nam, K. / Neb Technologies (Reino Unido)	NP de plata
US20070256251 A1	2007	Washing and cleaning products comprising immobilized active ingredients	Orlich, B., Richter, B., Plantenberg, T. / Henkel KGaA (Alemania)	MP y NP de sílice/zeolita
US20100234263 A1	2010	Nano-fluids as cleaning compositions for cleaning soiled surfaces, a method for formulation and use	Wasan, D.T., Nikolov, A.D., McDonald, M.R., Hecht, S.E. / Procter & Gamble (EEUU)	NP inorgánicas
US7858573 B2	2010	Process for making a detergent composition containing a sulfonic acid/carboxylic acid copolymer and a hydrophobic silica	Sommerville, N.P. / Procter & Gamble (EEUU)	MP de sílice
US8546316 B2	2013	Liquid detergent composition with natural abrasive particles	Perez-Prat, E.M., Gonzales, D.A., Asmanidou, A., Fernández, S. / Procter & Gamble (EEUU)	MP de origen natural y poliméricas
CA 2696324 C	2013	Process for making a detergent composition	Sommerville, N.P. / Procter & Gamble (EEUU)	MP y NP de sílice
US8815786 B2	2014	Detergents or cleaning agents containing reaction products of odorants with metal oxides	Meine, G., Eutebach, A., Sonnenschein, F., Bunn, R., Gabriel, S., Smyrek, H., Materne, M., Rittler, F. / Henkel KGaA (Alemania)	MP y NP de óxidos metálicos

1.5 Limpieza de superficies duras mediante electrólisis

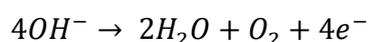
La electrólisis es la descomposición química de sustancias o electrolitos por el paso de una corriente eléctrica a través de dichas sustancias, bien en modo disuelto o fundido. Estas sustancias se ionizan y cuando la corriente eléctrica circula a través de la solución por medio de electrodos, los iones se mueven hacia los electrodos de carga opuesta. Así, ceden su carga para pasar a átomos o compuestos no cargados que son liberados y que se depositan en los electrodos o reaccionan químicamente con ellos. La electrólisis tiene un amplio rango de aplicaciones industriales, utilizándose principalmente en procesos como la galvanoplastia o la anodización. Por otra parte, también tiene aplicaciones en la limpieza, pulido o desinfección de superficies, si bien hasta ahora no se ha explotado suficientemente su potencial para estos fines (Chen, 2006).

A continuación se hace una revisión de los métodos de limpieza de superficies duras basados en la electrólisis. Estos métodos son la base del dispositivo para limpieza de almidón con corriente continua que se presenta en esta Tesis Doctoral y cuyo principio de funcionamiento se describe en el apartado 2.9.

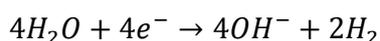
1.5.1 Limpieza electroquímica de metales

La limpieza electroquímica o electrolítica es un proceso utilizado en la preparación de superficies metálicas. Se caracteriza fundamentalmente por el uso de corriente continua y de un electrolito. La superficie a limpiar puede actuar como ánodo, cátodo o ambos dependiendo de la aplicación deseada.

Cuando se aplica la corriente eléctrica a un sistema de limpieza electroquímica tienen lugar las reacciones de oxidación y reducción abajo indicadas, debidas esencialmente a la electrólisis del agua (Zaki, 2007). Se suelen utilizar disoluciones alcalinas en el proceso. En el ánodo tiene lugar la reacción:



Mientras que en el cátodo tendrá lugar la reacción:



Como se puede observar, se desprende el doble de hidrógeno que de oxígeno en el proceso.

Hay tres tipos de limpieza electroquímica en función de la polaridad de la superficie metálica a limpiar:

En la **limpieza anódica** la superficie se conecta al ánodo, por lo que se cargará positivamente. En este electrodo se libera oxígeno al paso de la corriente. La generación de este gas realiza una acción mecánica de arrastre, pudiendo desprender y elevar la suciedad hacia la superficie. En la cercanía de este electrodo tiene lugar un descenso de pH. Este ambiente ácido es propicio para la eliminación de los depósitos minerales (Chen, 2006). Se deben ajustar correctamente los parámetros del sistema de limpieza (densidad de corriente, alcalinidad del baño) para evitar la oxidación en la superficie metálica a limpiar (Zaki, 2007).

En la **limpieza catódica** la superficie se conecta al cátodo por lo que se cargará negativamente. Como se puede deducir de la estequiometría de las reacciones de oxidación y reducción que tienen lugar, en este electrodo se desprende el doble de gas hidrógeno que oxígeno en el ánodo, produciéndose una mayor acción de arrastre de la suciedad. En las proximidades del cátodo se produce una mayor concentración de iones hidroxilo y por tanto un aumento del pH. Esto favorece el hinchamiento de suciedades como los depósitos proteicos, facilitando su eliminación.

En ambos sistemas, además, se favorece la limpieza de suciedades apolares (grasas) por desorción debido a la polarización de las superficies (Augustsson *et al.*, 1986).

Por último, la **limpieza de inversión periódica** se utiliza en metales ferrosos y utiliza una combinación de ambas limpiezas, anódica y catódica. La unidad de inversión periódica tiene un mecanismo que invierte la polaridad a intervalos fijados (se suele usar un intervalo de 10 segundos).

Se han patentado diversos dispositivos y soluciones de lavado que optimicen los resultados de limpieza de superficies metálicas. Así, por ejemplo, Naganuma *et al.* (1973) proponen una solución de sales alcalinas de ácido glicólico, imino-diacético o nitrilo-tetracético para la limpieza de aceites, grasas, materiales sólidos y películas de óxido de la superficie de sustratos metálicos usándolos como electrodo en un baño electrolítico que contenga dicha solución detergente. Chen (2006) patentó un método para aplicar la limpieza electroquímica a componentes de una máquina *in situ*, conectando dicho componente a un sistema de electrólisis de forma que éste constituya uno de sus electrodos. La invención está orientada a su uso en la limpieza de cambiadores de calor donde cada una de las placas se conecta a un electrodo de modo alterno haciéndose circular la solución de limpieza a través de las placas. Las soluciones utilizadas son tanto ácidas (ácido fosfórico) como alcalinas (hidróxido sódico). Recientemente, Pettee *et al.* (2011) han patentado tanto composiciones como métodos para la producción de limpiadores electroquímicos (generados a partir de la electrólisis de diversas soluciones de carbonatos y/o sales) destinados a la descontaminación de superficies.

1.5.2 Agua electrolizada. Aplicación a la limpieza y desinfección en la industria alimentaria

La electrólisis del agua es también el principio a partir del cual se genera el agua electrolizada (EW), cuyo uso en la limpieza y desinfección tanto de alimentos como de equipos en la industria alimentaria se ha incrementado en los últimos años. La producción de EW sólo requiere agua y cloruro sódico, y presenta las siguientes ventajas sobre otros agentes de limpieza tradicionales: desinfecta de forma efectiva, facilita las operaciones de limpieza, es de bajo coste y no es perjudicial para el medio ambiente (Huang *et al.*, 2008).

La producción de EW se inició en Japón (Shimizu y Hurusawa, 1992). Se genera haciendo pasar una disolución diluida de sal a través de una célula electrolítica, en la cual el ánodo y el cátodo están separados por una membrana (Figura 1.12). Sometiendo a los electrodos a voltajes de corriente continua los iones negativos (cloruro e hidróxido) se desplazan hacia el ánodo para ceder electrones y pasar a oxígeno gas, cloro gas, ión hipoclorito, ácido hipocloroso y ácido clorhídrico. Por otra parte, los iones cargados positivamente como el hidrógeno y el sodio se

desplazan hacia el cátodo para tomar electrones y pasar a hidrógeno gaseoso e hidróxido sódico.

Se generan simultáneamente, por tanto, dos tipos de agua. En el ánodo se genera agua electrolizada oxidante (EOW) con un bajo pH (2.3-2.7), alto potencial de oxidación-reducción y altas cantidades de oxígeno disuelto y de cloro libre. En el cátodo se genera el agua electrolizada reductora (ERW) que se caracteriza por tener un pH alto (10-11.5), altas cantidades de hidrógeno disuelto y un bajo potencial de oxidación-reducción. Mientras que la EOW tiene un gran poder desinfectante, la ERW se utiliza para la limpieza de suciedad y grasas en distintos equipamientos de la industria alimentaria (Hsu, 2005).

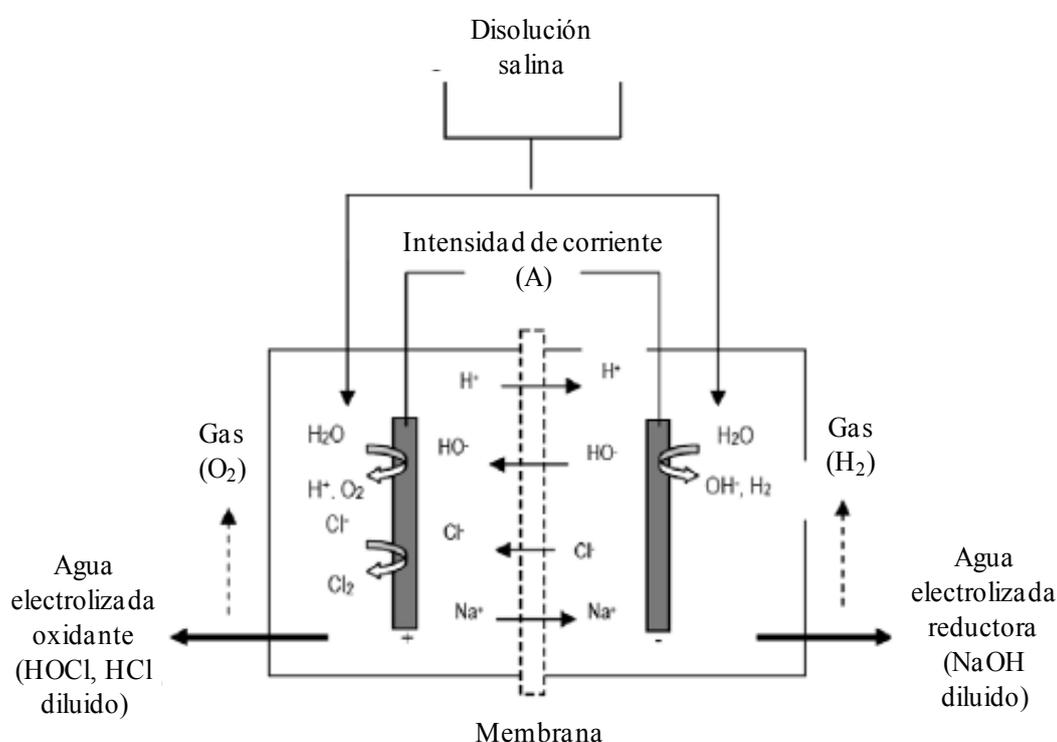
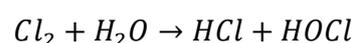
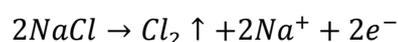
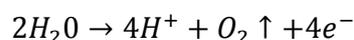


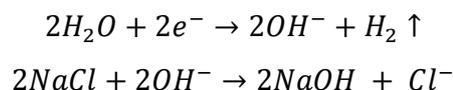
Fig. 1.12. Esquema de un generador de agua electrolizada (Huang *et al.*, 2008)

Las principales reacciones que tienen lugar en el generador de agua electrolizada son (Hatiet *et al.*, 2012):

Polo positivo (ánodo):



Polo negativo (cátodo):



El agua electrolizada oxidante (EOW) daña las membranas celulares, creando una disrupción en los procesos metabólicos que produce la muerte de las células (Hatiet *al.*, 2012). Se ha demostrado que el EOW tiene un gran potencial bactericida sobre los patógenos de mayor importancia en el campo de la seguridad alimentaria, tales como la *Escherichia coli* O157:H7 (Kim *et al.*, 2001), *Listeria monocytogenes* (Kim *et al.*, 2003), *Bacillus cereus* (Buck *et al.*, 2002) y *Salmonella sp.* (Fabrizio y Cutter, 2003).

El EOW resulta también efectivo en su aplicación directa en alimentos frescos para reducir el número de microorganismos o patógenos presentes. Se ha utilizado para desinfectar vegetales frescos, semillas de alfalfa, brécol, fresas, lechugas, tomates y diversas aves (Fabrizio *et al.*, 2002; Bari *et al.*, 2003, Saefkow *et al.*, 2010). Su principal inconveniente es que la solución pierde rápidamente su actividad antimicrobiana si no se tiene un aporte continuo de iones hidrógeno, hipoclorito y cloro gaseoso procedentes de la electrólisis. Por otra parte, su elevada acidez y su contenido en cloro libre pueden dar problemas de corrosión. Recientemente Jadeja y Hung (2014) han propuesto una posible solución utilizando con éxito aguas electrolizadas oxidantes modificadas para elevar su pH a valores casi neutros o alcalinos, aplicándolas a la desinfección de pieles de vacuno.

Ayebah y Hung (2005) indicaron que el agua electrolizada no causa efecto adverso en el acero inoxidable, por lo que puede usarse con total seguridad para la desinfección de gran cantidad de superficies en la industria de procesamiento de alimentos. En este sentido, diversos trabajos han ilustrado la eficacia del agua electrolizada en la limpieza y desinfección de sistemas CIP en la industria láctea. Así, Walker *et al.* (2005a) indicaron que un lavado de 10 minutos con agua electrolizada reductora (ERW) seguido de otro lavado de la misma duración con EOW a 60°C eliminaba satisfactoriamente todas las bacterias detectables de las superficies no porosas en contacto con residuos lácteos contaminados. Los mismos autores utilizaron ERW seguida de EOW para la limpieza de pequeñas piezas de materiales

utilizados en sistemas de procesamiento de leche cruda, realizando la limpieza por inmersión en el agua electrolizada con agitación y a diferentes tiempos y temperaturas (Walker *et al.*, 2005b). En un trabajo posterior los autores optimizaron experimentalmente las temperaturas de las soluciones de lavado, obteniendo el óptimo de eficacia desinfectante para el mismo sistema de procesamiento de leche en 58.8 °C en la ERW y 39.3 °C para la EOW (Dev *et al.*, 2014).

El agua electrolizada también se utiliza para el lavado y desinfección de vajillas y utensilios de mesa. Price *et al.* (2003) patentaron un lavavajillas que incorpora una célula electrolítica por medio de la cual se genera agua electrolizada (a partir de soluciones detergentes conteniendo sales halogenadas) de forma intermitente y proporcionando así compuestos desinfectantes en determinados momentos de los ciclos de lavado y enjuagado. Posteriormente Scheper *et al.* (2010) patentaron diversas formulaciones específicas para el lavado de vajillas en equipos con células electrolíticas incorporadas.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Sustrato

Se denomina sustrato a la superficie que es ensuciada con el objetivo de evaluar la eficacia de lavado de las distintas formulaciones detergentes y métodos de limpieza. Se trata de esferas elaboradas a partir de fibras de acero inoxidable. Cada una de ellas se preparó con un diámetro aproximado de 2 cm y un peso comprendido entre 0.80 y 0.85 g. Las fibras de acero inoxidable tienen un diámetro de 0.51 mm y las esferas una fracción aproximada de huecos del 93% para esferas sin suciedad y del 82% para esferas ensuciadas.

2.2 Suciedad

Como agente de ensuciamiento o suciedad se utilizó almidón de maíz (Maizena®) gelificado y posteriormente secado sobre el sustrato según el método indicado en el apartado 2.6.

2.3 Tensioactivos

En este trabajo de investigación se han utilizado siete tensioactivos aniónicos y no iónicos de cinco familias químicas diferentes: un lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), dos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (ECA), un alcohol etoxilado (AE), un alquilpoliglucósido (APG) y dos ésteres de glicerina polietoxilados (PGE). La selección se realizó atendiendo a criterios ambientales así como a su frecuencia de uso en las formulaciones detergentes actuales. La selección de dos tensioactivos de la misma familia se ha realizado considerando aquellos de similar longitud de cadena hidrocarbonada y mayor diferencia en el grado de etoxilación. En la Tabla 2.1 se muestran sus principales características. El tensioactivo LAS fue suministrado por Petresa, S.A. (Cádiz, España) y el APG por HenkelKgaA, (Düsseldorf, Alemania). El resto de tensioactivos utilizados fueron suministrados por Kao Corporation S.A. (Barcelona, España). Todas las disoluciones acuosas de tensioactivos se indican como concentración de tensioactivo en base seca.

Tabla 2.1. Descripción de los tensioactivos

Clasificación	Denominación	Estructura	Composición química	HLB	Humedad (% peso)	CMC (g/L)	Peso molecular (g/mol)	Número DID-list/ Degradación aerobia/ Degradación anaerobia
Aniónicos								
Lineal alquilbenceno sulfonato	LAS		R= C ₁₀ -C ₁₃ ^a	-	54.6 ^a	0.025 (25 °C) ^d	-	2001 ^g / Fácilmente biodegradable / No biodegradable
Ácido alquil éter carboxílico (aniónico a pH=7)	ECA-OE ₃	R-O-(CH ₂ CH ₂ O) _n -CH ₂ COOH	R= C ₁₂ -C ₁₄ ^a n=2.5 ^a	-	7.0 ^a	0.033 (25 °C) ^e	356 ^a	2028 ^g / Fácilmente biodegradable / No testado
	ECA-OE ₁₀		R= C ₁₂ -C ₁₄ ^a n=10 ^a	-	8.0-12.0 ^a	0.071 (25 °C) ^e	686 ^a	2028 ^g / Fácilmente biodegradable/ No testado
No iónicos								
Alcohol graso etoxilado	AE	R-(O-CH ₂ -CH ₂) _n -OH	R= C ₁₂ (70%), C ₁₄ (30%) ^a n=9.9 ^b	14.3 ^a	0.3 ^b	0.021 (37 °C) ^f	629 ^b	2111 ^g /Fácilmente biodegradable/ Biodegradable
Alquilpoli-glucósido	APG		R=C ₈ -C ₁₄ ^b DP =1.3 ^b	11.9 ^b	50.4 ^b	0.073 (37 °C) ^f	397 ^b	2134 ^g / Fácilmente biodegradable/ Biodegradable
Éster de glicerina polietoxilado	PGE-OE ₂	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{R} \\ \\ \text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{R} \\ \\ \text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_z\text{R} \end{array}$	x+y+z=2 R= H o R'-CO ^a	11.3 ^a	4.9 ^c	0.0193 (40 °C)	298	43 ^h /Fácilmente biodegradable / Biodegradable
	PGE-OE ₁₇		x+y+z=17 R= H o R'-CO ^a	13.0 ^a	3.3 ^c	0.0343 ⁱ (40 °C)	1129 ⁱ	44 ^h /Fácilmente biodegradable / Biodegradable

^aDato suministrado por el fabricante

^bBravo *et al.*, 2005

^cJurado *et al.*, 2012a

^dRíos, 2014

^eJurado *et al.*, 2012b

^gDegradación según directrices de la OCDE (Detergent Ingredients Database DID-list, 2014)

^hDegradación según directrices de la OCDE (Detergent Ingredients Database DID-list, 2004)

ⁱMartínez-Gallegos, 2015 (datos no publicados)

2.4 Enzima

La enzima utilizada es una α -amilasa procedente de *Bacillus Licheniformis* (forma líquida con densidad 1.26 g/mL, ref. A3403, Sigma-Aldrich) al igual que la mayor parte de las enzimas utilizadas en formulaciones detergentes (Pongsawasdi y Murakami, 2010, Herbots *et al.*, 2011). Esta enzima comercial presenta una actividad ≥ 500 unidades/mg de proteína (dato del fabricante) definiendo una unidad como la cantidad de enzima que libera 1.0 mg de maltosa a partir de almidón en 3 minutos a pH 6.9 y 20 °C (Sigma, 1997). El contenido de proteína se ha determinado mediante el método Bradford (Bradford, 1976) obteniéndose un valor de 34.2 mg proteína/mL. El rango de pH adecuado para esta enzima es de 5-9, mostrando una actividad óptima entre 7 y 9. La temperatura de almacenamiento recomendada es 2-8 °C.

En este trabajo se ha estudiado el efecto que tiene la incorporación de α -amilasa a formulaciones detergentes utilizadas en el proceso de lavado de almidón seco gelatinizado, así como la actividad de esta enzima en presencia de tensioactivos.

2.5 Métodos de análisis

2.5.1 Análisis de tensioactivos

2.5.1.1 Determinación de alcohol etoxilado(AE) mediante el método colorimétrico del yodo-yoduro

Este método se ha utilizado para determinar la concentración de alcohol graso etoxilado (AE). El método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo no iónico y el reactivo yodo-yoduro. Es un método semi-específico para tensioactivos no iónicos ya que el método no distingue el tensioactivo concreto de que se trata(Brown y Jaffé, 2001; Jurado *et al.* 2002b).

El reactivo yodo-yoduro se prepara disolviendo 1 g de yodo resublimado (calidad QP, Panreac) y 2 g de yoduro potásico (KI, calidad PA, Panreac) en 100 ml

de agua destilada. Esta solución debe conservarse en frasco de vidrio color topacio y ha de renovarse cada 8 días.

Para determinar la concentración de tensioactivo se añade 0.25 mL de reactivo yodo-yoduro sobre 10 mL de cada una de las muestras de disolución de tensioactivo, se agita y se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente. El complejo coloreado se determina espectrofotométricamente a 500 nm (espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible, Varian) siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración de tensioactivo no iónico. Debe prepararse una recta de calibrado para cada tensioactivo no iónico ensayado.

Para la realización de la recta patrón de AE se parte de disoluciones acuosas de AE de concentración 0, 2, 5, 10, 15 y 20 mg/L a partir de una disolución madre de 1 g/L. En la Figura 2.1 se muestra la recta de calibrado para el AE y en la Tabla 2.2 los resultados experimentales obtenidos.

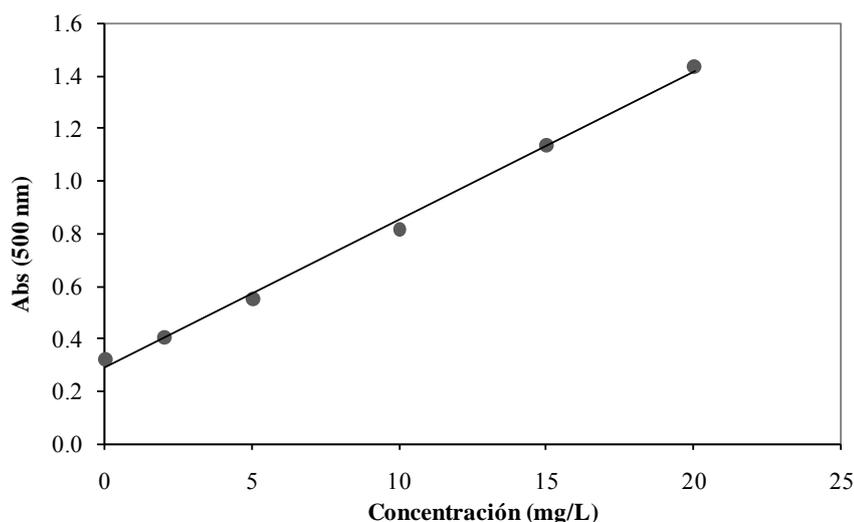


Figura 2.1. Determinación de AE mediante el método colorimétrico del yodo-yoduro. Recta patrón

Tabla 2.2. Determinación de AE mediante el método colorimétrico del yodo-yoduro. Recta patrón

Concentración (mg/L)	0	2	5	10	15	20
Abs (500 nm)	0.3182	0.4010	0.5480	0.8184	1.1354	1.4392

$$Abs(500\text{ nm}) = 0.2866 + 0.0565 \cdot \text{Concentración (mg/L)} \quad R^2=0.9969$$

2.5.1.2 Determinación de alquilpoliglucósidos (APG) mediante el método de la antrona

Este método es una adaptación de un método de análisis de carbohidratos y se ha utilizado para determinar la concentración de alquilpoliglucósidos (APG). La antrona ($C_{14}H_{10}O$) forma productos coloreados de color verde cuando se calienta conjuntamente con carbohidratos en una solución ácida. Por otra parte, el medio ácido hidroliza el enlace glicosídico de la sacarosa por lo que en estas condiciones los alquilpoliglucósidos serán hidrolizados a alcoholes grasos y carbohidratos, y podrán ser determinados mediante este método.

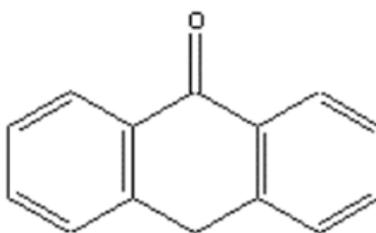


Figura 2.2. Estructura de la antrona

Para este análisis se prepara el reactivo de antrona en solución de ácido sulfúrico concentrado al 0.8% w/w disolviendo 1.4758 g de reactivo de antrona (calidad PA, Panreac) sobre 100 mL de ácido sulfúrico concentrado al 95% (calidad PA, AnalaR Normapur®, VWR). El reactivo deberá prepararse preferentemente un día antes de su uso, pudiéndose utilizar un día más.

Para la determinación del APG se ha utilizado una adaptación del método descrito por Buschmann *et al.* (1995). Para ello 5 mL de solución de reactivo de antrona se vierte en 2 mL de muestra. La mezcla se hidroliza durante 5 minutos en termostato a 100 °C (en digestor modelo Spectroquant TR 320, Merck) y posteriormente se enfría en baño de hielo durante 10 minutos. La absorbancia de la mezcla se determina espectrofotométricamente a 622 nm (Cary 100 Bio UV-Visible, Varian). La concentración de APG se obtiene por comparación con la correspondiente recta de calibrado.

Para la realización de la recta patrón del APG se parte de disoluciones de concentración 0, 10, 25, 50, 75 y 100 mg/L preparadas a partir de una disolución madre de 1 g/L de APG. Los resultados se muestran en la Figura 2.3 y Tabla 2.3.

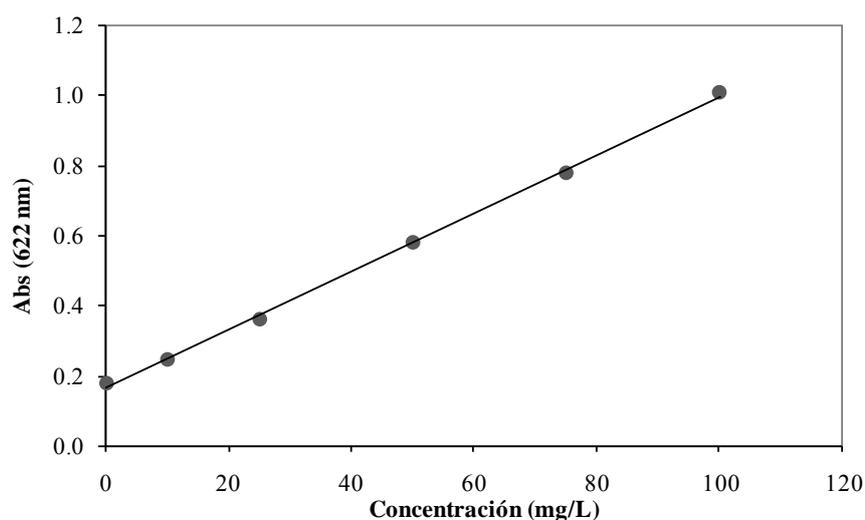


Figura 2.3. Determinación de APG mediante el método colorimétrico de la antrona. Recta patrón

Tabla 2.3. Determinación de APG mediante el método colorimétrico de la antrona. Recta patrón

Concentración (mg/L)	0	10	25	50	75	100
Abs (622nm)	0.1787	0.2441	0.3630	0.5834	0.7789	1.0100

$$Abs(622\text{ nm}) = 0.1649 + 0.0083 \cdot \text{Concentración (mg/L)} \quad R^2=0.9989$$

2.5.2 Determinación de almidón mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico

La detergencia en los ensayos de lavado realizados en el dispositivo de lavado utilizado(BSF) se determina evaluando la concentración de almidón presente en disolución a diferentes tiempos de lavado. La determinación del almidón presente en la solución de lavado se realiza evaluando la cantidad total de carbohidratos solubles. Estos se analizan mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Para este método se requiere:

- Ácido sulfúrico 2 N preparado a partir de ácido sulfúrico 95%, PA AnalaR Normapur® VWR.
- Fenol 5 % (w/v) preparado en agua destilada a partir de fenol cristal (calidad PA, Panreac) previamente licuado por calentamiento en baño termostaticado. Esta solución debe conservarse en envase cerrado y protegido de la luz, ya que puede oscurecer gradualmente tras la exposición a la luz y al aire.

El procedimiento de análisis es el siguiente: se añade 1 mL de muestra del baño de lavado sobre 1mL de ácido sulfúrico 2 N. A continuación se colocan en un digestor (Spectroquant TR 320, Merck) a 100 °C durante 30 minutos. Posteriormente se enfría la muestra en un baño con hielo obteniéndose un almidón hidrolizado químicamente. Posteriormente se añade 0.10 mL de la mezcla del digestor sobre 4.9 mL de agua destilada (dilución final 1:100). Finalmente se añaden 0.5 mL de esta dilución a 0.5 mL de solución fenol al 5% (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 95% (PA, AnalaR Normapur®, VWR). Se agita en vórtex y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia de cada muestra a 490 nm (Cary 100 Bio UV-Visible, Varian).

Para expresar los resultados experimentales en términos de concentración de almidón se comparará la absorbancia obtenida con una recta patrón de glucosa realizada previamente. El resultado se multiplica por el factor de corrección 0.9, que representa la relación estequiométrica entre almidón y glucosa en la hidrólisis ácida del almidón (Lampitt *et al.*, 1947; Jaiswal y Prakash, 2011).

Para la realización de la recta patrón de almidón se parte de disoluciones acuosas de D-glucosa anhidra (PA, Panreac) de 0, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 mg/L a partir de una disolución madre de 1 g/L. Los resultados se muestran en la Figura 2.4, donde se representa la absorbancia medida a 490 nm. En la Tabla 2.4 se muestran los valores numéricos junto con el ajuste obtenido.

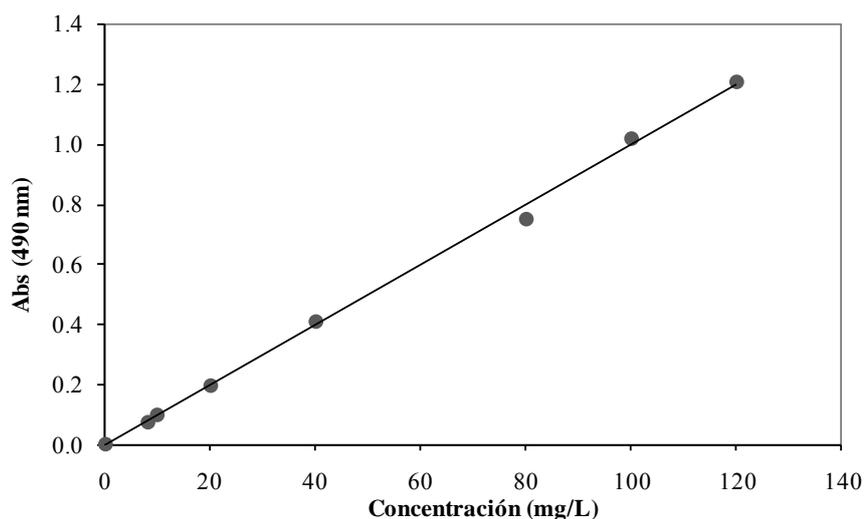


Figura 2.4. Determinación de glucosa por el método colorimétrico del fenol-sulfúrico. Recta patrón

Tabla 2.4. Determinación de glucosa por el método colorimétrico del fenol-sulfúrico. Recta patrón

Concentración (mg/L)	0	8	10	20	40	80	100	120
Abs corregida (490nm)	0	0.0732	0.0978	0.1939	0.4075	0.7514	1.0171	1.2067

$$Abs(490\text{ nm}) = 0.009937 \cdot \text{Concentración (mg/L)} \quad R^2=0.9988$$

2.5.3 Determinación de la actividad de la enzima α -amilasa mediante el método yodométrico

El método yodométrico para determinar la actividad de la α -amilasa se basa en la capacidad de la amilosa para formar un complejo de inclusión con yodo. Para ello se añade una disolución de almidón sobre una disolución de yodo-yoduro potásico. Este complejo da una coloración azul que se mide espectrofotométricamente. Cuando se hidroliza el almidón por acción de la amilasa la intensidad de la coloración azul disminuye, y la absorbancia medida será inversamente proporcional a la actividad enzimática.

Mensualmente se evaluó la actividad de la α -amilasa mediante una adaptación del método yodométrico (Fuwa, 1954) utilizada por Jurado *et al.* (2011c).

La medida de la actividad de la α -amilasa requiere la preparación de las siguientes disoluciones:

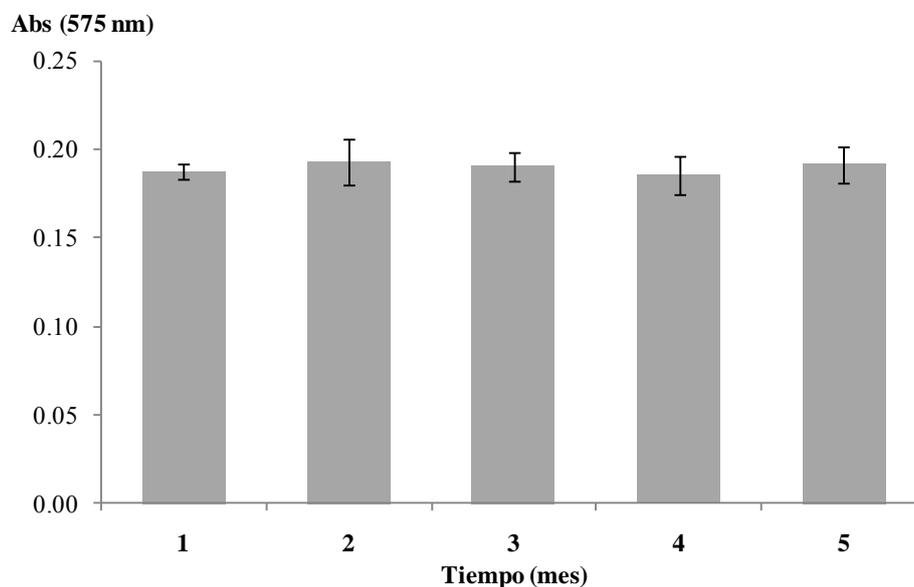
- *Disolución 0.2% I₂ – 2% KI:* 0.1 g de I₂ (yodo resublimado, calidad QP, Panreac) y 1 g de KI (calidad PA, Panreac) disueltos en 50 mL de agua desionizada (resistividad de 18.2 M Ω .cm). Debe guardarse en frasco de vidrio color topacio.
- *Disolución de almidón soluble 1% (p/v):* Se añade 0.5 g de almidón soluble de patata (calidad PA, Panreac) sobre 50 mL de agua desionizada. La mezcla se calienta hasta ebullición y se agita durante 3 minutos mediante agitador magnético (Martínez-Gallegos, 2005). La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente con agitación y se enrasa en matraz aforado hasta 50 mL.
- *Disolución 2 N HCl*a partir de ácido clorhídrico 37% (PA AnalaR Normapur[®], VWR).
- *Disolución de enzima:* La enzima se utilizó con una dilución 1/800 (Jurado *et al.*, 2011c), preparándose la disolución en agua desionizada inmediatamente antes de iniciar cada ensayo.

La medida de actividad se realiza de la siguiente manera: en baño termostático (modelo Ultraterm, casa P-Selecta) a 60 °C se mantienen tubos roscados con 1 mL de disolución de almidón 1% (p/v) y 3.99 mL de agua desionizada. Una vez alcanzada la temperatura se añaden 10 μ L de disolución de enzima. Transcurridos 25 minutos se desactiva la enzima por adición de 3 mL de HCl 2N y enfriamiento en baño de hielo. El blanco se realiza con 4.99 mL de agua desionizada y 10 μ L de disolución de enzima. Posteriormente se añaden 100 μ L de la solución de almidón con enzima desactivada sobre 100 μ L de solución yodo-yoduro y se adiciona 4.8 mL de agua desionizada. Transcurridos 10 minutos se mide en espectrofotómetro la absorbancia a 575 nm (Martínez-Gallegos, 2005).

En la Tabla 2.5 se muestra la actividad que presenta la enzima durante el tiempo en que se llevó a cabo la experimentación. En la Figura 2.5 se puede observar que la absorbancia permanece constante por lo que la actividad de la α -amilasa no se ha visto alterada durante el tiempo de experimentación.

Tabla 2.5. Actividad de la enzima α -amilasa en el tiempo de experimentación

Tiempo (mes)	1	2	3	4	5
Abs (575 nm)	0.1878	0.1933	0.1905	0.1856	0.1916
SD	0.0040	0.0131	0.0079	0.0110	0.0105

**Figura 2.5. Actividad de la enzima α -amilasa en el tiempo de experimentación**

2.5.4 Determinación de la actividad enzimática en presencia de tensioactivos mediante el método DNS

El método yodométrico no resulta adecuado para la determinación de la actividad de la α -amilasa en presencia de tensioactivos debido a la conocida capacidad de formación de complejos entre éstos y el almidón (indicado en apartado 1.1.1). La formación de dichos complejos interfiere con la formación del complejo yodo-almidón que constituye la base de dicho método (Kim y Robinson, 1979). Para la determinación de la actividad de la α -amilasa en estas condiciones se ha utilizado el método DNS, ampliamente extendido y utilizado en estudios de caracterización de amilasas para diversos usos industriales, entre ellos la formulación de detergentes (Mitidieri *et al.*, 2006; Hmidet *et al.*, 2009; Shafiei *et al.*, 2011; Roy y Mukherjee, 2013).

La hidrólisis del almidón genera nuevos grupos reductores, uno por cada enlace hidrolizado, debido a la oxidación del carbono anomérico situado en el extremo reductor. Sobre la disolución de almidón hidrolizado se añade el ácido 3,5

dinitrosalicílico (DNS)(Bernfeld, 1955) y tiene lugar una reacción redox en la que los grupos reductores se oxidan y el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) se reduce perdiendo una de sus configuraciones 3 o 5, pasando a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Esto produce un cambio de color de la disolución, que pasa de amarillo a rojo, medible espectrofotométricamente a 540 nm. Para la cuantificación de la cantidad de extremos reductores generados se suele utilizar como referencia la maltosa para la elaboración de la recta patrón.

Para la preparación del reactivo DNS se siguieron las indicaciones del procedimiento de ensayo de actividad de amilasa descrito por Sigma (1997):

- (i) Se prepara una **solución de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado**. Para ello se añaden 4.0 g de NaOH (Sharlau) en 24 mL de agua desionizada, calentando la mezcla hasta 50-70 °C. Posteriormente se disuelven 36 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (calidad PA, Panreac), manteniéndose el calentamiento con agitación hasta disolver.
- (ii) Se prepara una **solución 96 mM de ácido 3,5 dinitrosalicílico** (PS, Panreac) en un volumen de 60 mL de agua desionizada a 50-70 °C. La mezcla se mantiene en calentamiento con agitación hasta disolver.
- (iii) El **reactivo DNS** se prepara sobre 36 mL de agua desionizada calentada hasta 50-70 °C. Se añade lentamente sobre ella la solución de tartrato de sodio y potasio preparada en (i), seguida de la solución de ácido 3,5 dinitrosalicílico preparada en (ii) y se agita hasta disolver. El reactivo DNS debe guardarse en frasco color topacio y es estable durante 6 meses.

Los ensayos de actividad enzimática en presencia de tensioactivos se realizaron a pH 7 en baño termostático a 60 °C (Ultraterm, casa P-Selecta) durante 5 minutos. Las diferentes mezclas de reacción se elaboraron a partir de las siguientes disoluciones:

- *Disolución pH 7*: Tampón fosfato 0.1 M preparado según Sørensen (1909). Se disuelve 1.82 g de KH_2PO_4 (PA, Panreac) y 4.47 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PRS, Panreac) en 500 mL de agua desionizada.

- *Disolución de almidón soluble 6.00 g/L:* Se prepara una disolución acuosa de almidón soluble de patata (PA, Panreac) sobre el tampón pH 7.
- *Disolución de enzima:* Se utilizó la α -amilasa procedente de *B. Licheniformis* (ver apartado 2.4). Inmediatamente antes de iniciar cada ensayo se prepara una disolución de enzima de 0.18 g/L sobre tampón pH 7.
- *Disoluciones de tensioactivos:* se preparan disoluciones de tensioactivo de concentración 3.00 g/L sobre tampón pH 7. Se analizó el efecto que tienen sobre la enzima cada uno de los tensioactivos descritos en la Tabla 2.1.

El ensayo se realiza de la siguiente forma: en un tubo de ensayo se añade 1 mL de disolución de almidón y, en función del ensayo, 1 mL de disolución de tensioactivo y/o 1 mL de disolución de enzima hasta alcanzar un volumen total de 3 mL con disolución pH 7, si se requiere. Las concentraciones finales son 2.00 g/L de almidón, 1.00 g/L de tensioactivo y 0.06 g/L de enzima. Estas concentraciones y las condiciones de ensayo utilizadas (pH 7, 60 °C) reproducen las utilizadas en los ensayos de lavado en el dispositivo BSF. Esto permite comparar los resultados de actividad enzimática con los valores de detergencia obtenidos con soluciones de lavado que contienen tensioactivos y α -amilasa. Cada solución enzimática ensayada (con y sin tensioactivo) se midió frente a un blanco donde la solución de enzima se sustituye por disolución tampón pH 7.

El procedimiento de ensayo es el siguiente: las muestras que contienen la disolución de almidón y tensioactivos se mantuvieron en el baño hasta alcanzar la temperatura deseada. La solución de enzima (1 mL) o la solución tampón pH 7 (si se trata del blanco) se añadió inmediatamente antes de iniciar el ensayo. Transcurridos 5 minutos los tubos se enfrían en baño de hielo y se procede a la determinación de los azúcares reductores generados según el procedimiento adaptado de Sigma (1997). Para ello a cada tubo de ensayo se añade 1 mL de reactivo DNS y se llevan a un digestor a 100 °C (modelo Spectroquant TR 320, Merck). Una vez en el digestor se añade 1 mL de disolución de enzima en los blancos y 1 mL de tampón pH 7 en las soluciones que contienen enzimas. Las mezclas se mantienen durante 15 minutos a 100 °C y finalizado ese tiempo se enfrían en baño de hielo hasta temperatura ambiente (3 minutos). A continuación se centrifugan durante 10 min a 9000 g (centrífuga Universal 320R, Hettich). Finalmente se toma 1 mL de cada muestra y se diluye con 5 mL de agua desionizada, procediendo a la lectura de absorbancia a

540 nm. Todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron por quintuplicado. En la Figura 2.6 se muestra un esquema del método utilizado.

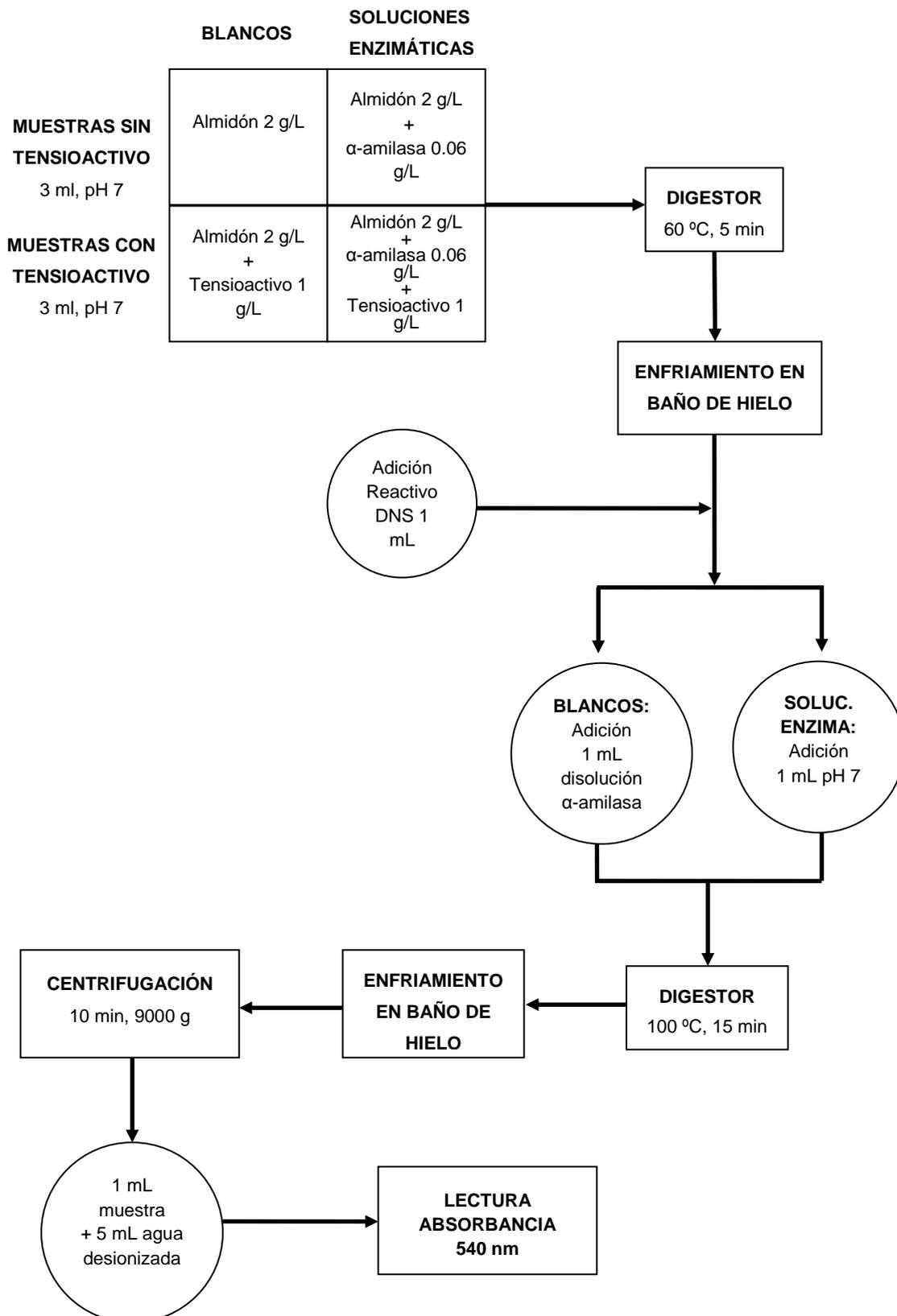


Figura 2.6. Método analítico para la determinación de la actividad enzimática en presencia de tensioactivos mediante el método DNS

La cuantificación de los extremos reductores generados se ha realizado a partir de una recta de calibrado de maltosa. Para la realización de la recta patrón se parte de una disoluciones acuosas de maltosa de 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 mg/L preparados a partir de una disolución madre 0.2 % (p/v) de maltosa 1-hidrato (PRS, Panreac).

Siguiendo con el procedimiento descrito, a 3 mL de cada una de las disoluciones se añade 1 mL de reactivo DNS y 1 mL de agua desionizada a cada uno de ellos. Posteriormente se introduce en el digestor durante 15 minutos a 100 °C, se toma 1 mL de cada muestra y se diluye con 5 mL de agua desionizada. A continuación se determina su absorbancia a 540 nm restando la absorbancia del blanco. En la Figura 2.7 y Tabla 2.6 se muestran los resultados obtenidos junto con la recta de ajuste.

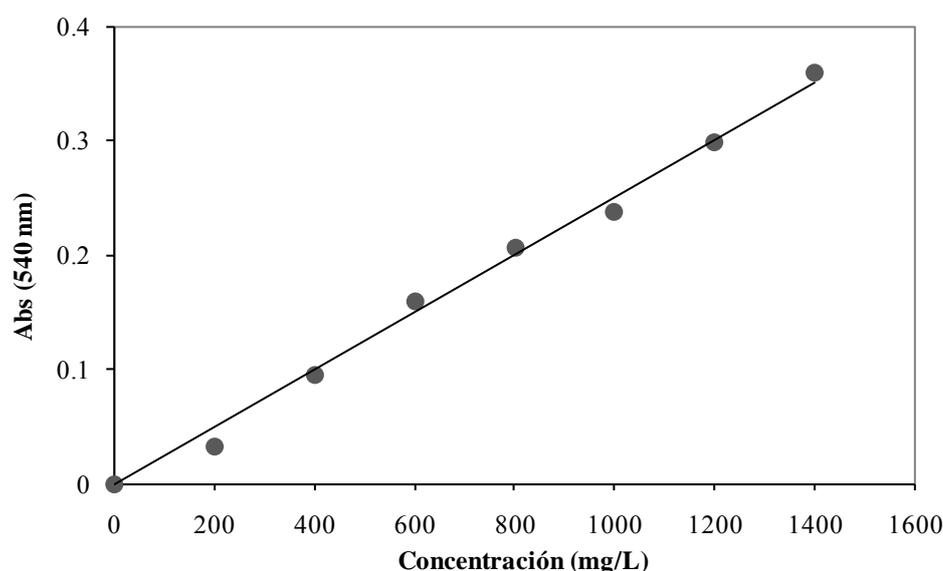


Figura 2.7. Determinación de azúcares reductores de maltosa por el método DNS. Recta patrón

Tabla 2.6. Determinación de azúcares reductores de maltosa por el método DNS. Recta patrón

Concentración (mg/L)	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
Abs corregida (490nm)	0	0.0317	0.0952	0.1594	0.2075	0.2388	0.2993	0.3602

$$Abs(540\text{ nm}) = 0.000251 \cdot \text{Concentración (mg/L)} \quad R^2=0.9980$$

2.5.4.1 Cálculo de la actividad enzimática y de la actividad relativa

Se ha definido la unidad de actividad enzimática de la α -amilasa (U) como la cantidad de azúcares reductores equivalentes a un micromol de maltosa generado por miligramo de enzima y por minuto. Dicha actividad (A) se calcula a partir de la Ecuación 2.1 considerando la concentración de maltosa obtenida mediante la recta patrón (C_m , mg/L) (según ecuación de Tabla 2.6), la concentración de enzima (C_e , mg/L), el peso molecular de la maltosa (342.29 g/mol) y el tiempo de reacción (5 minutos):

$$A \left(U, \frac{\mu mol \text{ maltosa}}{mg \text{ enzima} \cdot min} \right) = 0.584 \frac{C_m}{C_e} \quad \text{Ec. (2.1)}$$

Para cuantificar la influencia de la presencia de tensioactivos en la hidrólisis enzimática del almidón se define la actividad relativa como el cociente entre la actividad en presencia de tensioactivo partido de la actividad en su ausencia:

$$AR(\%) = \frac{A_T}{A} \cdot 100 \quad \text{Ec. (2.2)}$$

Donde:

AR = Actividad relativa (%).

A = Actividad enzimática en ausencia de tensioactivo (U).

A_T = Actividad enzimática en presencia de tensioactivo (U).

2.6 Método de ensuciamiento de sustrato con almidón

Se estableció un protocolo para preparar y depositar sobre el sustrato el agente de ensuciamiento. Como sustrato se utilizaron esferas hechas a partir de fibras de acero inoxidable preparadas según el procedimiento descrito en el apartado 2.1. El agente de suciedad es almidón de maíz (Maizena®) gelatinizado obtenido por calentamiento de una suspensión (8% en peso) a 70 °C con agitación constante durante una hora (Souza y Andrade, 2002). En este proceso es de especial importancia que la temperatura no supere en ningún momento los 73 °C para no rebasar el rango de temperatura de gelatinización para este tipo de almidón

(Biliaderis, 2009). El gel así preparado se deja enfriar a temperatura ambiente y reposar al menos 12 h antes de ser utilizado.

Transcurrido este tiempo se ensucian las esferas de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- (i) Cada esfera es sumergida en el gel de tal forma que la superficie de ésta quede empapada de almidón de la forma más homogénea posible evitando grumos y zonas sin ensuciar.
- (ii) Las esferas ensuciadas se colocan en una rejilla y se llevan a una estufa a 60 °C (modelo Hotcold-S, P-Selecta) donde se dejan secar durante 12 horas.
- (iii) Finalmente una vez secas se registra el peso de las esferas. En los ensayos de lavado en el dispositivo BSF el peso de sustrato y suciedad se registró para cada grupo de 8 esferas, mientras que en los ensayos de lavado mediante corriente continua se pesaron individualmente cada una de las 5 esferas utilizadas antes y después de ensuciar.

La cantidad de almidón retenido sobre el sustrato se determina por diferencia de pesada entre las esferas limpias y sucias. Esta masa debe ser lo más constante posible. En los ensayos en BSF las 8 esferas utilizadas en cada ensayo de lavado contienen una masa de almidón seco de 2.0 ± 0.2 g. En la Figura 2.8 se muestra a modo de ejemplo una imagen de un grupo de esferas sin ensuciar y una vez ensuciadas utilizadas en un ensayo de lavado. Para cada uno de los ensayos realizados con corriente continua se seleccionaron grupos de 5 esferas cuya masa total de almidón seco retenido es de 1.25 ± 0.15 g, siguiendo la misma proporcionalidad entre masa de sustrato y masa de suciedad que en los ensayos en BSF.

Al ser porosas estas esferas no sólo tienen suciedad adherida en la superficie sino también en su interior. De esta forma se simulan las características de las instalaciones industriales con suciedad incrustada. Tanto el uso de almidón seco como la elección de un sustrato rugoso donde se dificulta el mojado por parte de la solución de lavado dificulta el proceso de limpieza y por tanto permite observar mejor la influencia que ejercen las distintas condiciones experimentales estudiadas

sobre la detergencia (Gómez Herrera, 1996). Además el sustrato, o superficie donde se adhiere el almidón seco (acero inoxidable), es apropiada para simular la interacción almidón-sustrato que se encuentra frecuentemente en la industria alimentaria, ya que el acero inoxidable es el material más utilizado en este tipo de instalaciones (Schmidt, 1997).

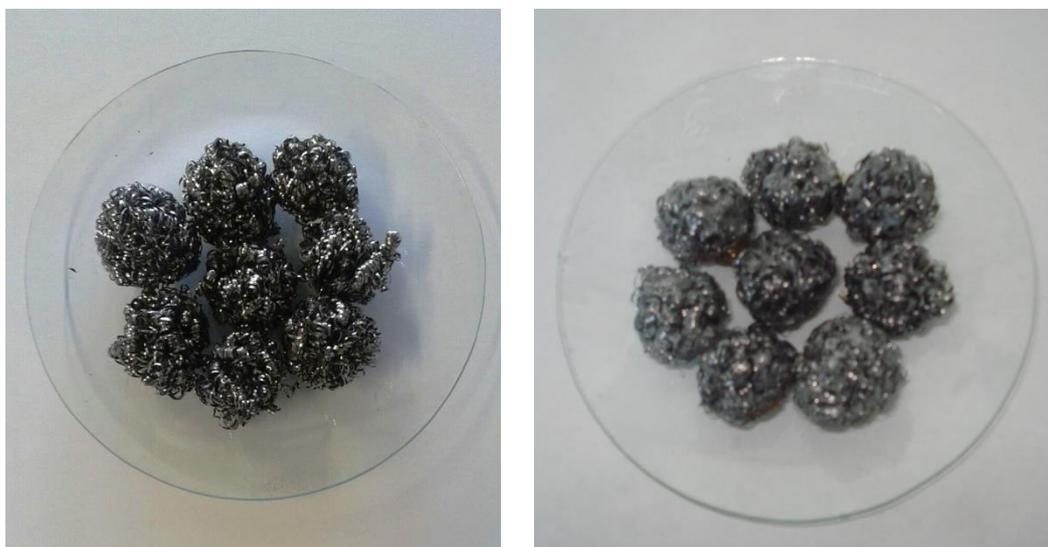


Figura 2.8. Esferas limpias y una vez ensuciadas con almidón seco

Se caracterizó el almidón seco utilizado en base a su análisis proximal y su contenido en minerales. Para ello se secan las muestras a 110 °C hasta alcanzar un peso constante. El contenido en proteínas se determinó por el método Kjeldahl utilizando un factor de conversión de 6.25, mientras que el contenido en grasas se obtuvo por el método Soxhlet previa hidrólisis ácida. Los carbohidratos se determinaron por diferencia aritmética con respecto al resto de componentes.

El contenido en sales se determinó por espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) utilizando un equipo Perkin-Elmer Optima 8300 a partir de las cenizas de la muestra en disolución. Para el análisis de Ca, Mg, K y Na, las muestras (15 g) se depositan en crisoles cerámicos y se calcinan en horno mufla a 550 °C durante una hora. Se añaden 0.1 g de cenizas en una solución HNO₃/HF (1/1) y se calienta a 160 °C hasta sequedad. A continuación se añaden 4 mL de HNO₃ y se calientan a 80 °C durante una hora. Una vez enfriada la mezcla se diluye hasta 100 mL. En la Tabla 2.7 se muestra la composición del gel de almidón seco.

Tabla 2.7. Análisis proximal y contenido en minerales de la suciedad (almidón seco)

Composición, g/100 g producto	
Proteína	0.37
Grasa	0.42
Hidratos de Carbono	90.37
Humedad	7.84
Cenizas	0.99
Minerales	Composición, mg/100 g producto
Sodio	46.55
Calcio	38.96
Potasio	290.36
Magnesio	32.55

2.7 Descripción del dispositivo BSF y del procedimiento de lavado

El lavado de almidón seco adherido al sustrato (acero inoxidable) se llevó a cabo en el dispositivo Baño-Sustrato-Flujo (BSF) (Jurado *et al.*, 2002a, 2003). Se trata de un dispositivo diseñado para evaluar la eficacia detergente de fórmulas detergentes y condiciones de lavado utilizadas para la limpieza de superficies duras. El dispositivo BSF simula un sistema “Cleaning In Place” (CIP) de limpieza industrial. Su utilidad para el estudio de la eficacia detergente de formulaciones detergentes aplicadas a diferentes suciedades y sustratos ha quedado demostrada en trabajos anteriores (Jurado *et al.* 2004, 2006, 2007, 2011a, 2011b, 2011c, 2014).

El dispositivo BSF permite modificar los elementos principales que intervienen en el proceso detergente: sustrato, suciedad, composición del baño de lavado, pH, temperatura y caudal de recirculación del sistema. Se puede determinar la eficacia del proceso de lavado analizando la suciedad retirada del sustrato. En la Figura 2.9 se muestra un esquema simplificado del dispositivo BSF donde **(1)** es un tanque agitado encamisado que contiene la solución de lavado (400 mL de capacidad) con un termómetro y un medidor de pH, **(2)** es una columna de relleno (50 mL de capacidad, 2.5 cm de diámetro y 8.5 cm de altura) donde se deposita el sustrato previamente impregnado del agente de ensuciamiento; **(3)** es un baño termostático

(modelo Ultraterm, casa P-Selecta) que permite termostatar el tanque y la columna; (4) es una bomba peristáltica (modelo 5006, Heidolph) y (5) es un agitador (modelo RZR 1, Heidolph). La disolución de lavado se recircula desde el tanque hacia el interior de la columna por donde fluye en sentido ascendente, retornando posteriormente hacia el tanque.

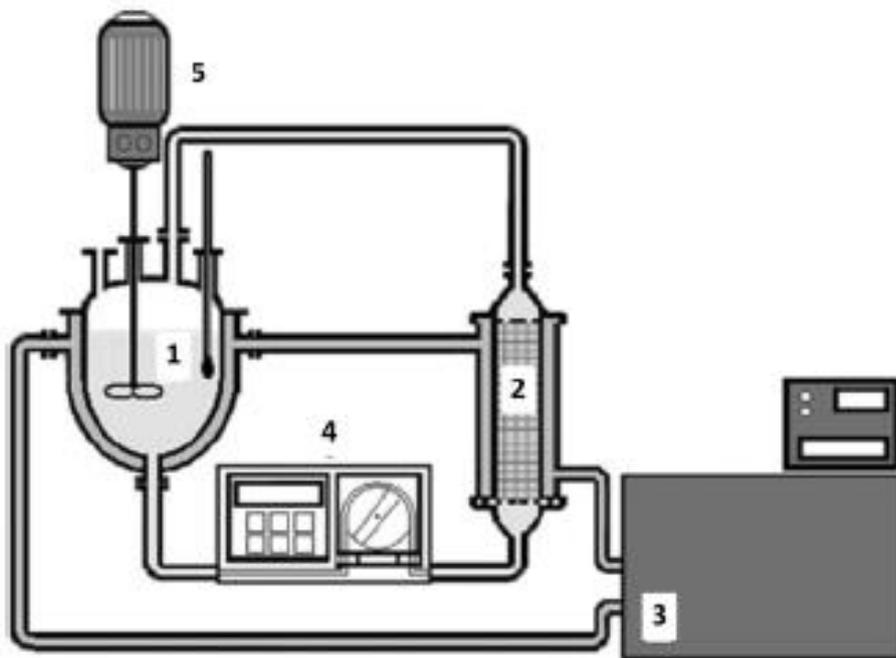


Fig. 2.9. Esquema del dispositivo BSF (Baño-Sustrato-Flujo)

El sistema utiliza un volumen de baño de lavado de 500 mL. El termómetro permite la medida de la temperatura en el tanque agitado y el caudal de recirculación de la solución de lavado se determina mediante el uso de un rotámetro.

El procedimiento a seguir en cada uno de los ensayos de lavado ha sido:

- (i) Preparación de la solución de lavado (500 mL). Si la solución contiene micro- o nanopartículas se prepara una suspensión de 250 mL en una solución del pH deseado de acuerdo con lo indicado en 2.8.3. Si la solución de lavado contiene enzima ésta se añade sobre la solución de pH deseado y por último, si procede, se añade el tensioactivo. En todos los ensayos de lavado realizados con tensioactivo se utilizó una concentración de 1.0 g/L(en base seca).
- (ii) Adición de la solución de lavado al tanque y termostatación de la misma.

- (iii)** Introducción del sustrato con agente de ensuciamiento en la columna de relleno. En la Fig. 2.10 se puede observar el aspecto final de la columna rellena con el sustrato.



Fig. 2.10. Detalle del sistema BSF. Disposición del sustrato ensuciado en la columna

- (iv)** Toma de la muestra de control del baño a tiempo inicial y accionamiento de la bomba dando lugar al comienzo del proceso de lavado.
- (v)** Toma de 1 mL de muestra periódicamente durante 45 minutos.
- (vi)** Determinación de la concentración de almidón en el baño de lavado (según apartado 2.5.2) en función del tiempo.
- (vii)** Limpieza del dispositivo BSF. Tras finalizar cada experimento se vacía la disolución de lavado y se recircula agua caliente a 50 °C durante 3 ciclos de 5 minutos. La columna se limpia manualmente con un cepillo, completándose el lavado con la recirculación de agua destilada en 2 ciclos de 5 minutos de duración.

El rendimiento deterensivo o detergencia (De, %) se calcula en cada una de las muestras tomadas durante el ensayo como el porcentaje de suciedad que queda en el baño de lavado ($m_{\text{baño}}$) con respecto a la cantidad total de almidón adherido al sustrato al inicio del proceso ($m_{\text{almidón}}$), según la ecuación:

$$\text{De}(\%) = \frac{m_{\text{baño}}}{m_{\text{almidón}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (2.3)}$$

La $m_{\text{baño}}$ se determina a partir de la concentración de almidón retirado del sustrato y que se encuentra suspendido o disuelto en el baño de lavado. Se determina por el método colorimétrico del fenol-sulfúrico (apartado 2.5.2) teniendo en cuenta el volumen de solución de lavado utilizado. La cantidad de almidón total ($m_{\text{almidón}}$) es la correspondiente a la masa de almidón seco inicial que posee el grupo de 8 esferas utilizado en cada ensayo. Para aplicar la Ecuación 2.3 se asume que la composición del baño es la misma en cada punto del sistema (hipótesis de mezcla perfecta), hipótesis verificada experimentalmente. También se considera que el volumen de muestra extraída del BSF es despreciable (Jurado *et al.*, 2011c). Esta hipótesis es asumible puesto que el volumen total de muestra extraída es muy pequeño.

2.8 Estudio de la influencia del uso de micropartículas y nanopartículas sobre los tensioactivos y el proceso de lavado

2.8.1 Micropartículas y nanopartículas utilizadas

En este trabajo se han utilizado micro- y nanopartículas de dos materiales diferentes: sílice y magnetita. Por una parte, se han usado las partículas de sílice hidrófila porosa Sipernat[®]50 (S50) y de sílice pirogénica hidrófila no porosa Aerosil[®]200 (A200) y Aerosil[®]380 (A380), suministradas por Evonik Industries AG (Hanau-Wolfgang, Germany). Se trata de micropartículas y nanopartículas utilizadas como aditivos en gran número de aplicaciones industriales por su capacidad de adsorción y de control de la reología y tixotropía de sistemas líquidos.

Dentro de las partículas coloidales (nano- y micromateriales) la sílice ofrece muchas ventajas debido a que son químicamente inertes, hidrofílicas, presentan una gran estabilidad estructural, son aceptables para el medio ambiente y resistentes a los disolventes orgánicos (Li *et al.*, 2011). Concretamente, se han utilizado como parte de formulaciones para lavado de suciedad alimentaria por Lee *et al.* (2009a) y Soleimani *et al.* (2012, 2013). En la Tabla 2.8 se muestran sus principales propiedades, según información proporcionada por el proveedor.

Tabla 2.8. Propiedades de las partículas de sílice utilizadas

	Sipernat 50 (S50)	Aerosil 200 (A200)	Aerosil 380 (A380)
Sup. específica (m²/g)	500	200 ± 25	380 ± 30
Densidad aparente (g/L)	180	50	50
Diámetro medio (nm)	50000	12	7

Por otra parte, se han realizado estudios de adsorción de tensioactivos sobre micro- y nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) con el fin de estudiar su utilidad como componente de fórmulas detergentes. Las partículas de magnetita se utilizan cada vez con mayor frecuencia como vehículo para inmovilización de enzimas (entre ellas, la α-amilasa) con múltiples aplicaciones industriales (Mukherjee *et al.*, 2010; Netto *et al.*, 2013). Concretamente, se realizaron experimentos con nanopartículas de magnetita de diámetro < 50 nm (NP50) y con micropartículas de diámetro < 5 μm (MP5), ambas proporcionadas por Sigma-Aldrich con las respectivas referencias 637106-25G y 310069-25G. En la Tabla 2.9 se muestran sus principales propiedades según información del proveedor.

Tabla 2.9. Propiedades de las partículas de magnetita utilizadas

	MP5	NP50
Pureza (%)	95	97
Sup. específica (m²/g)	-	>60
Densidad aparente (g/mL)	4.8 – 5.1	4.8 – 5.1
Diámetro medio (nm)	< 5000	<50

2.8.2 Disoluciones utilizadas

Los ensayos de lavado se realizaron en condiciones de pH constante 7, 10 y 13, utilizando las siguientes disoluciones:

- *Disolución pH 7:* Tampón fosfato 0.1 M preparado según Sørensen (1909). Se disuelve 1.82 g de KH_2PO_4 (PA, Panreac) y 4.47 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PRS, Panreac) en 500 mL de agua desionizada.
- *Disolución pH 10:* Tampón carbonato-bicarbonato, preparado según Delory y King (1945). Disolución acuosa de concentración 2.87 g/L de Na_2CO_3 (PA, Panreac) y 1.85 g/L de NaHCO_3 (PA, Panreac).
- *Disolución pH 13:* Disolución acuosa de concentración 4.09 g/L de KCl (PA, Panreac) y 5.80 g/L de NaOH (Sharlau).

2.8.3 Preparación de soluciones de tensioactivos con micro/nanopartículas en suspensión

Para el estudio de las formulaciones detergentes con micropartículas (en adelante MP) o nanopartículas (en adelante NP) se prepararon diversas soluciones de tensioactivos no iónicos con estas partículas en suspensión. El procedimiento, tanto en los ensayos de lavado en el dispositivo BSF como en los experimentos de interacción entre los tensioactivos y las partículas, es el siguiente: se preparó una suspensión de MP o NP en la concentración requerida, bien en agua destilada (en los ensayos de interacción) o en disolución a pH constante (en los ensayos de lavado). Se aplican ultrasonidos durante 15 minutos a 250 mL de la suspensión (Sonorex RK 106S, Bandelin). Una vez obtenida la suspensión de partículas, si procede, se añade 125 mL de solución madre de tensioactivo no iónico de concentración 4 g/L para alcanzar una concentración final de tensioactivo de 1 g/L. Finalmente se enrasa hasta un volumen de 500 mL y se agita manualmente.

2.8.4 Interacción entre tensioactivos no iónicos y micro/nanopartículas en soluciones acuosas

Con el fin de conocer el comportamiento de las MP y NP en el seno de una solución detergente se estudió la interacción de las partículas de sílice S50, A200 y A380 con tensioactivos no iónicos (AE y APG) en solución acuosa. También se estudió la interacción de las partículas de magnetita MP5 y NP50 con el tensioactivo AE. La interacción entre los tensioactivos no iónicos y las partículas se estudió en suspensiones con concentraciones de partículas de 0 a 1.0 g/L (preparadas según se indica en apartado 2.8.3) y una concentración de 1.0 g/L de tensioactivo en todas ellas. Como blanco se utilizó una disolución de tensioactivo no iónico de 1.0 g/L sin partículas en suspensión. Una vez preparadas las suspensiones de partículas en tensioactivo no iónico según el procedimiento descrito en 2.8.3, se sometieron a agitación manual suave durante 5 minutos para favorecer la interacción entre el tensioactivo y las partículas. A continuación se tomó una muestra de 50 mL de cada una de ellas y se centrifugó durante 15 minutos a 8000 g en el equipo Universal 320R, (Hettich). Finalmente se tomó un volumen suficiente de sobrenadante para determinar la determinación de la concentración de tensioactivo no iónico (AE o APG) de acuerdo con el método correspondiente (ver apartados 2.5.1.1 y 2.5.1.2). Retirando las partículas se puede estudiar si existe interacción entre el tensioactivo y las partículas, determinándose si éste queda retenido por adsorción en la superficie de las ellas (Kumar *et al.*, 2012). En el caso de las partículas de magnetita, éstas se retiraron aplicando un potente imán (modelo Q-40-40-20, composición $Nd_2Fe_{14}B$ y magnetización N42, Supermagnete), esperando hasta que la suspensión perdiera su turbidez.

2.8.5 Influencia de las partículas en la determinación del almidón

Previamente a la realización de los experimentos de lavado en el dispositivo BSF y la determinación de la detergencia por medio del método colorimétrico fenol-sulfúrico, se realizaron unas pruebas para discernir si la presencia de las partículas en la solución de lavado podría alterar la lectura de absorbancia y afectar al cálculo de la concentración de almidón presente en el baño. Para ello se prepararon mezclas con concentraciones similares a las disoluciones utilizadas en el baño de lavado, con

y sin partículas de sílice. De cada una de ellas se tomaron muestras de 1 mL a las que se les aplicó el método fenol-sulfúrico según se describe en 2.5.2. El ensayo se realizó por triplicado. Se ensayaron las siguientes muestras:

- (1) Agua destilada.
- (2) Suspensión de 0.1 g/L de S50 en agua destilada. Para conseguir una suspensión estable la mezcla se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos (ver apartado 2.8.3).
- (3) Solución de 2.0 g/L de almidón de maíz (Maizena®) preparada a partir de disolución madre de 4 g/L. Se prepara a temperatura ambiente y se mantiene en todo momento en agitación suave para evitar la precipitación.
- (4) Solución de 2 g/L de almidón de maíz (Maizena®) y 0.1 g/L S50. La suspensión de partículas se somete a ultrasonidos durante 15 minutos. Posteriormente, se añade disolución madre de almidón y se enrasa hasta alcanzar el volumen final, manteniendo en todo momento agitación suave.

En la Tabla 2.10 se muestran las lecturas de absorbancia de cada una de las muestras. Se puede comprobar que el porcentaje de variación en el valor de absorbancia entre las muestras (1) y (2), así como entre las muestras (3) y (4), es muy pequeño e inferior a la desviación standard entre las tres réplicas de cada ensayo. A partir de estos resultados se descarta la influencia de las micropartículas de sílice hidrófila sobre las medidas de absorbancia obtenidas por el método fenol-sulfúrico.

Tabla 2.10. Influencia de S50 sobre la determinación de almidón por el método de fenol-sulfúrico

Muestra	Absorbancia			Abs promedio	SD (%)		
(1)	0.0590	0.0586	0.0558	0.0578	3.01	Variación entre muestras (1) y (2) (%)	2.82
(2)	0.0573	0.0598	0.0613	0.0594	3.40		
(3)	0.2664	0.2496	0.2406	0.2522	5.19	Variación entre muestras (3) y (4) (%)	-3.53
(4)	0.2679	0.2207	0.2414	0.2433	9.71		

2.8.6 Diseño de experimentos para la modelización de la detergencia en soluciones de lavado que contienen partículas y tensioactivos no iónicos

El estudio de la influencia de partículas sobre la detergencia alcanzada con fórmulas detergentes que contienen tensioactivos no iónicos se planificó de acuerdo con la metodología del Diseño Estadístico de Experimentos. Esta metodología se aplica fundamentalmente al análisis de problemas en los cuales la variable respuesta a estudiar está influenciada por otras variables, llamadas factores, y su aplicación tiene el objetivo final de desarrollar, mejorar y optimizar productos y procesos (Montgomery, 2004).

Toda estrategia del Diseño de Experimentos está orientada a establecer una relación causa/efecto entre los factores y las respuestas mediante la realización de un número mínimo de experimentos, presentando esta relación la siguiente forma:

$$Y_i = f(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad \text{Ec. (2.4)}$$

Donde Y_i corresponde a la(s) respuesta(s) y X_1, X_2, \dots, X_k , los factores estudiados.

En este trabajo se optó por utilizar un diseño factorial completo para planificar los experimentos. Este diseño se caracteriza porque se llevan a cabo todas las posibles combinaciones de niveles de los factores (Lazić, 2004). El diseño factorial

más utilizado es el de K factores (Montgomery, 2004), cada uno de los cuales se estudia a dos niveles que se definen por el signo + (nivel alto) y – (nivel bajo) o en escala codificada por +1 y -1. Este tipo de diseño cuando se tienen K factores se nombra como diseño factorial 2^k . En general, el número total de experimentos con K factores es 2^k .

En este diseño se estudiaron tres factores con dos niveles cada uno: concentración de micropartícula S50 (CMP en g/L, estudiada a los niveles 0 y 1), pH (estudiado a los niveles 7 y 13) y caudal (Q en L/h, estudiado a los niveles 30 y 60), teniendo como variable respuesta la detergencia (en %) a tiempo final del ensayo De_f (45 minutos). Por tanto, la matriz de experimentos constará de ocho ensayos. De entre las partículas estudiadas se seleccionó la S50 por ser la que demostró una mayor interacción con los tensioactivos no iónicos y a la vez formaba una suspensión estable en el tiempo (ver apartado 3.1.1). En la Tabla 2.11 se resumen las condiciones de ensayo utilizadas en los diseños de experimentos con partículas S50 dentro del dispositivo BSF.

Tabla 2.11. Diseño factorial para ensayos de lavado con partículas S50. Condiciones de operación

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable.	
Suciedad: almidón seco.	
Agitación: 60 rpm.	
Temperatura: 40 °C.	
Factores	Niveles
Concentración de S50 (CMP, g/L)	0 / 1
pH	7 / 13
Caudal de circulación (Q, L/h)	30 / 60

Gráficamente, se puede representar el diseño 2^3 por un cubo tal y como se muestra en la Fig. 2.11. Las flechas muestran la dirección de incremento de los factores, mientras que los números 1 a 8 en las esquinas del cubo hacen referencia al “orden standard” de los experimentos (NIST, 2012)

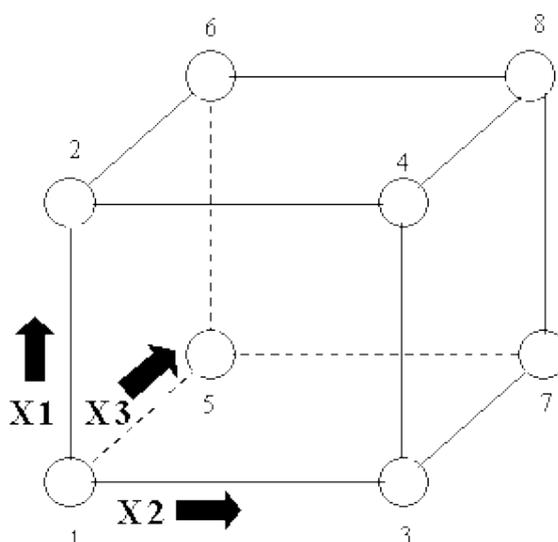


Fig. 2.11. Diseño factorial completo 2³. Factores X₁, X₂, X₃.

La matriz de experimentos, expresada en términos de variables de diseño (codificadas) y variables ensayadas (decodificadas) se muestra en la Tabla 2.12. Las condiciones de ensayo en las que los valores de los factores equivalen al nivel 0 (en valores codificados) son las condiciones del denominado “punto central”. La realización de experimentos en el punto central proporciona una estimación del error experimental y permite la realización de pruebas para verificar la bondad de ajuste del modelo. Para la planificación de este diseño de experimentos, así como para el ajuste y simulación conforme al modelo empírico generado, se ha utilizado el software Modde 6.0 (Umetrics).

Tabla 2.12. Matriz de experimentos del diseño factorial para ensayos de lavado con partículas S50

Exp.	Variables de diseño			Variables ensayadas		
	CMP(g/L)	pH	Q (g/L)	CMP (g/L)	pH	Q (L/h)
1	-1	-1	-1	0	7	30
2	1	-1	-1	1	7	30
3	-1	1	-1	0	13	30
4	1	1	-1	1	13	30
5	-1	-1	1	0	7	60
6	1	-1	1	1	7	60
7	-1	1	1	1	13	60
8	1	1	1	1	13	60
9	0	0	0	0.5	10	45
10	0	0	0	0.5	10	45
11	0	0	0	0.5	10	45

Con el fin de estudiar la influencia de las micropartículas S50 en el seno de distintas formulaciones detergentes se llevaron a cabo tres diseños factoriales

completos, con las características descritas en las Tablas anteriores 2.11 y 2.12, modificando la solución de lavado. Los diseños estudian la influencia de los factores CMP, pH y Q en la detergencia tiempo final D_e de las siguientes formulaciones:

- Diseño D1: Suspensión de micropartículas S50 en solución a pH constante (7, 10 y 13).
- Diseño D2: Suspensión de micropartículas S50 en solución de AE 1.0 g/L a pH constante (7, 10 y 13).
- Diseño D3: Suspensión de micropartículas S50 en solución de APG 1.0 g/L a pH constante (7, 10 y 13).

2.9 Procedimiento de limpieza de superficies metálicas mediante aplicación de corriente continua (electrocleaning)

El dispositivo que se describe a continuación se basa en los procedimientos de limpieza y desinfección de alimentos y superficies duras basados en la electrólisis del agua o de soluciones salinas. Dicho dispositivo así como el procedimiento de limpieza desarrollado ha sido patentado por Vicaria *et al.* (2014).

El sistema se basa en la circulación de corriente continua entre dos electrodos conectados a un generador. Uno de los electrodos es la esfera de fibras de acero inoxidable que se desea limpiar –sustrato con suciedad adherida- y el otro es una superficie metálica de igual material que el sustrato. Entre ellos existe una la solución de lavado que los cubre y que cierra el circuito. En este trabajo se ha utilizado el generador de corriente continua (en adelante, CC) TS3021S (Thandar Instruments). Este generador va a proporcionar CC a intensidad o voltaje constante con valores comprendidos entre 0-2 A y 0-30 V.

En cada ensayo de limpieza se utilizan cinco esferas de fibras de acero inoxidable ensuciadas con almidón seco de acuerdo con el procedimiento establecido en el apartado 2.1 para la preparación del sustrato y en 2.6 para el ensuciado. Estas cinco esferas se conectarán a uno de los polos del generador y se sumergen en la solución de lavado. El otro polo se conecta una esfera de fibras de acero inoxidable de masa similar a la suma de las masas de las cinco esferas a limpiar (4.1 g aproximadamente).

En la Fig. 2.12 (a) y (b) se muestra un esquema del dispositivo experimental y las partes que lo componen: **(1)** calefactor (Tectron 3473200, P-Selecta) con agitación, que permite controlar y modificar la temperatura de ensayo; **(2)** baño termostático; **(3)** cubeta que aloja la solución de lavado; **(4)** solución de lavado; **(5)** esferas de acero inoxidable ensuciadas con almidón seco que actúan como electrodo; **(6)** electrodo de polaridad opuesta y **(7)** es el generador de corriente continua. Como se puede observar en la Fig. 2.12 (b), las esferas sucias se conectan en paralelo a un polo del generador de forma que la distancia entre ellas y entre cada esfera sucia y el electrodo opuesto sea constante en todos los experimentos, puesto que la posición y distancia entre los electrodos puede influir en el desarrollo de las reacciones de electrólisis (Scheper *et al.*, 2010).

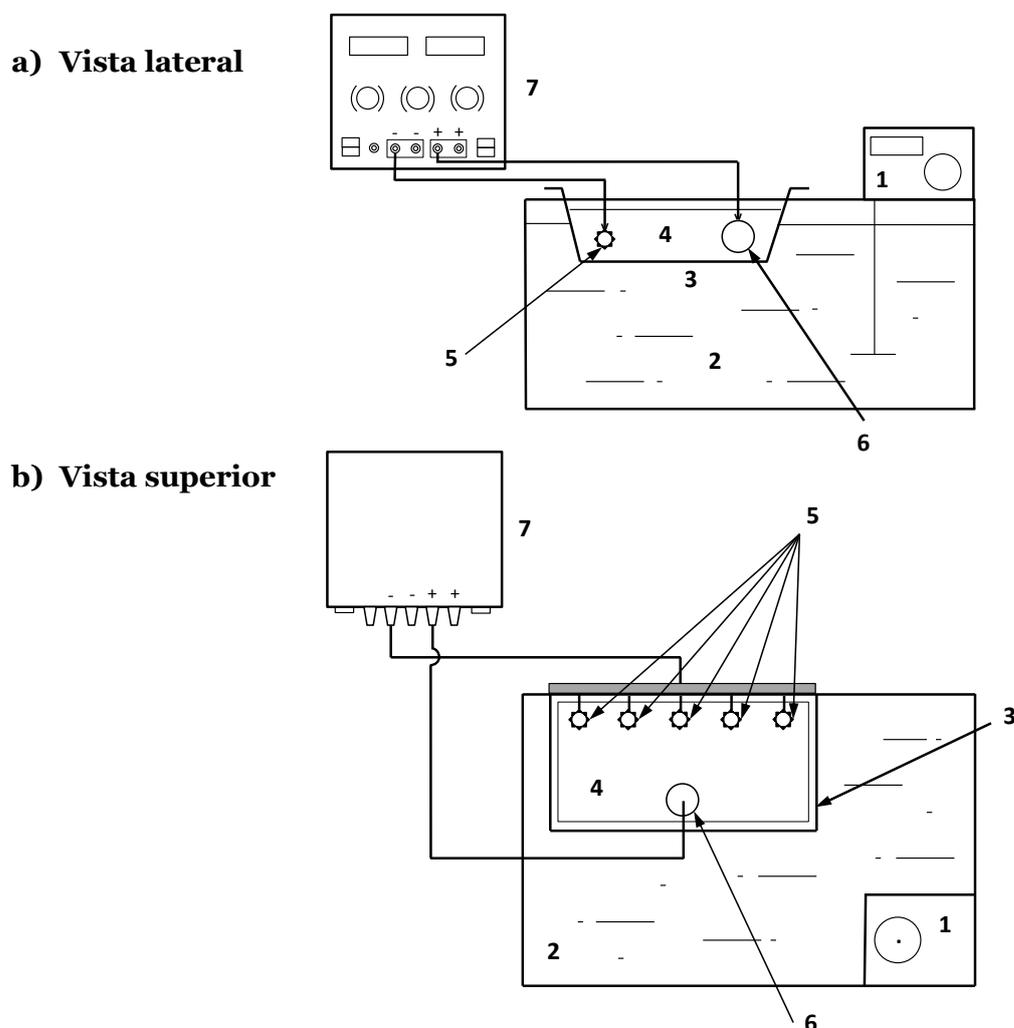


Fig. 2.12. Esquema del dispositivo experimental utilizado para la limpieza con corriente continua

El procedimiento a seguir en cada uno de los ensayos de lavado ha sido el siguiente:

- (i) Preparación de la solución de lavado.
- (ii) Adición de la solución de lavado a la cubeta y conexión del baño termostático a la temperatura elegida para el ensayo. Se medirá periódicamente la temperatura del recipiente hasta comprobar que la solución ha alcanzado la temperatura adecuada. A lo largo de cada experimento también se harán controles periódicos de temperatura.
- (iii) Conexión de cada una de las cinco esferas sucias a un electrodo. Si bien en diversos trabajos se han obtenido resultados satisfactorios en cuanto a limpieza y desinfección conectando la superficie metálica a limpiar tanto al ánodo como al cátodo de células electrolíticas, e incluso alternando ambas polaridades en el proceso (Naganuma *et al.*, 1973; Chen, 2006), el estudio se inició conectando las esferas sucias al cátodo (polo negativo) del generador, al modo utilizado en los procesos de limpieza catódica de metales (ver 1.5.1). La reacción de reducción que tiene lugar en él genera iones OH⁻, aumentando la alcalinidad en la proximidad del electrodo, lo que favorece la degradación (y por tanto la limpieza) del almidón (Lai *et al.*, 2004). Como consecuencia de esta reacción de reducción también se desprende H₂ en las proximidades del cátodo.
- (iv) Conexión de una esfera de fibras de acero inoxidable en el otro polo del generador que actuará como ánodo y donde se genera O₂.
- (v) Regulación del voltaje en el generador de CC para ajustarlo a las condiciones experimentales fijadas.
- (vi) Activación de la circulación de CC entre los electrodos y comienzo del experimento. La CC generada se mantendrá constante en voltaje durante todo el tiempo del experimento.
- (vii) Una vez transcurrido el tiempo fijado, se desconecta el generador de CC y las esferas se extraen del baño de lavado. Posteriormente secan en estufa (Hotcold-S, P-Selecta) a 60 °C durante 12 h. La esfera situada en el electrodo opuesto también se extraerá y se secará en la estufa de la misma forma.

El rendimiento detergente o detergencia (De, %) se calcula como el porcentaje de masa de almidón retirada de las esferas sucias una vez finalizado el ensayo de lavado. Para ello se evalúa el peso de las esferas de fibras de acero antes de ensuciar, una vez ensuciadas y tras el proceso de lavado (para lo cual se secarán en estufa durante un mínimo de 12 h). Se determina este parámetro para cada una de las cinco esferas utilizadas en cada experimento, obteniéndose la detergencia final como el valor medio de las cinco muestras utilizadas. El cálculo de la detergencia vendrá dado por la Ec. (2.5).

$$De(\%) = \frac{m_{\text{almidónlavado}}}{m_{\text{almidón}}} \cdot 100 = \frac{m_{\text{sustratosucio}} - m_{\text{sustratolavado}}}{m_{\text{sustratosucio}} - m_{\text{sustrato}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (2.5)}$$

Igualmente, después de cada ensayo se pesará el electrodo del polo positivo para determinar si existe variación de masa debida al proceso de electrólisis. Se realizaron un mínimo de tres réplicas en cada una de las condiciones experimentales fijadas con el fin de obtener la detergencia media y la desviación standard de cada experimento.

En la Fig. 2.13 se muestra un momento del ensayo de lavado. Se puede observar la generación de burbujas producida por la liberación de los gases producto de la electrólisis. El desprendimiento del almidón adherido al sustrato (ver 1.5.1) tiene lugar durante el proceso de electrólisis, quedando disperso en la solución de lavado.

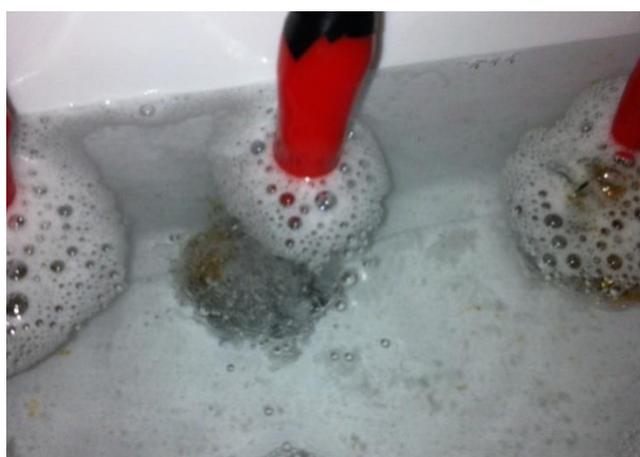


Fig. 2.13. Electrolimpieza de almidón seco adherido a esferas de acero inoxidable

El dispositivo para electrolimpieza de suciedades alimentarias adheridas a superficies metálicas permite la planificación de experimentos de lavado modificando diversas variables con el fin de obtener las condiciones óptimas de limpieza para la suciedad objeto de este estudio (almidón seco). En este trabajo se estudiaron las siguientes variables y rangos de operación, con el objetivo de encontrar las condiciones de trabajo y la solución de lavado óptimas:

- **Solución de lavado.** Se utilizan soluciones de lavado de pH 13, 10, 7 y 1. La solución pH 13 se preparó con NaOH (Sharlau). Las soluciones pH 7 y pH 10 se prepararon según se indica en el apartado 2.8.2. La solución de pH 1 se preparó utilizando HCl 37% (PA, AnalaR Normapur® de VWR). Además, se realizaron ensayos de lavado con soluciones de pH 13 y 1.0 g/L de tensioactivo, utilizando todos los tensioactivos que aparecen en la Tabla 2.1 (aniónicos y no iónicos).
- **Duración del ensayo.** Los ensayos de lavado se realizaron con una duración comprendida entre 10 y 20 minutos.
- **Voltaje aplicado.** Se estudió la limpieza mediante aplicación de corriente continua en un rango de 0 a 10 V.
- **Temperatura.** La eficacia de lavado se midió en un intervalo de temperatura comprendida entre 10 y 60 °C.

Además de estas variables se realizaron ensayos para estudiar la influencia de otros factores:

- **Inversión de la polaridad.** Si bien la planificación experimental se realizó priorizando la conexión de las esferas sucias al polo negativo (cátodo) para reproducir las características de la limpieza catódica, también se realizaron ensayos conectando las superficies a limpiar al ánodo para conocer el efecto sobre el lavado del almidón seco.
- **Mojado previo.** Puesto que el medio alcalino contribuye a la degradación del almidón a través de cambios en sus propiedades de hinchamiento y gelatinización (Wang y Copeland, 2012) se planificaron una serie de

experimentos en los que se estableció un tiempo de mojado de las esferas en la solución pH 13 (de 10 o 20 minutos) previo a la generación de corriente continua y al inicio del proceso de electrolimpieza. Con estos ensayos se buscaba analizar la influencia que tenía el mojado previo sobre la detergencia alcanzada.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Estudio del comportamiento de formulaciones detergentes que contienen partículas en el lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable

En este apartado se estudia la detergencia obtenida en la limpieza de almidón seco adherido a fibras de acero inoxidable cuando se utilizan soluciones de tensioactivos no iónicos que incorporan micro- y nanopartículas (MP y NP).

3.1.1 Estudio de interacción entre soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos y partículas

Siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 2.8.4 y 2.8.5 se ha evaluado la cantidad de AE y APG que queda en el sobrenadante una vez que se retiran las partículas de la solución de lavado mediante centrifugación. Las soluciones de lavado utilizadas contienen una concentración 1 g/L de tensioactivo y una concentración variable de partículas (0 - 1.0 g/L). De esta forma se pretende estudiar la interacción entre las partículas y los tensioactivos no iónicos determinando si existen fenómenos de adsorción del tensioactivo en la superficie de las partículas, así como cuantificar la extensión de dicho fenómeno.

Se realizaron experimentos en soluciones de 1.0 g/L de AE con las tres partículas de sílice estudiadas, las micropartículas Sipernat 50 (S50) y las nanopartículas Aerosil 200 (A200) y Aerosil 380 (A380). Se estudió también el comportamiento de las partículas S50 en presencia del tensioactivo no iónico APG. Los resultados de los experimentos con partículas de sílice se muestran en las Tablas 3.1 a 3.4. En ellas se muestran para cada concentración de ensayo:

- La concentración de tensioactivo no iónico (C_{AE} o C_{APG}) determinada a partir de medidas de absorbancia según el método colorimétrico correspondiente (yoduro para el AE y antrona para el APG, apartados 2.5.1.1 y 2.5.1.2).

- El porcentaje de tensioactivo residual en el sobrenadante (%RES), para cuyo cálculo se considera valor 100% la concentración de tensioactivo medida en ausencia de partículas.
- La desviación estándar de la concentración de tensioactivo residual (SD). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 3.1. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de AE y partículas S50)

C _{S50} (g/L)	C _{AE} (mg/L)	%RES	SD (mg/L)
0.00	965.31	100.00	-
0.005	853.63	92.48	3.87
0.01	913.66	99.16	0.34
0.05	944.81	94.03	8.09
0.10	807.43	83.72	2.91
0.20	818.67	84.96	6.59
0.30	797.46	82.59	0.83
0.50	730.91	75.70	2.39
0.75	671.28	70.07	4.66
1.00	608.01	63.82	5.07

Tabla 3.3. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de AE y partículas A380)

C _{A380} (g/L)	C _{AE} (mg/L)	%RES
0.00	1028.33	100.00
0.005	962.21	93.58
0.01	986.55	95.95
0.05	973.10	94.64
0.10	1003.98	97.64
0.20	1036.19	96.77
0.30	983.98	95.70
0.50	945.04	91.91
0.75	835.22	81.23
1.00	825.22	80.26

Tabla 3.2. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de AE y partículas A200)

C _{A200} (g/L)	C _{AE} (mg/L)	%RES
0.00	1026.46	100.00
0.005	1029.73	100.32
0.01	1026.28	99.98
0.05	996.11	97.04
0.10	1010.35	98.43
0.20	1007.96	98.20
0.30	972.74	94.77
0.50	956.81	93.21
0.75	919.47	89.58
1.00	813.45	79.25

Tabla 3.4. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de APG y partículas S50)

C _{S50} (g/L)	C _{APG} (mg/L)	%RES	SD (mg/L)
0.00	1079.52	100.00	-
0.005	1049.52	97.84	3.93
0.01	1013.86	95.14	7.46
0.05	980.00	91.92	5.74
0.10	1023.98	94.28	2.96
0.20	952.41	90.93	4.08
0.30	1125.06	103.93	6.50
0.50	951.33	90.46	3.53
0.75	1057.35	98.30	8.03
1.00	1135.78	101.20	6.06

Igualmente, se ha obtenido el porcentaje de tensioactivo AE residual que queda en sobrenadante en soluciones de 1.0 g/L de tensioactivo y concentraciones variables de partículas de magnetita (0 a 0.1 g/L) una vez que las partículas han sido retiradas mediante un imán, de acuerdo con el procedimiento descrito en 2.8.4. Se realizaron experimentos con nanopartículas de magnetita de diámetro < 50 nm (NP50) y con micropartículas de diámetro < 5 µm (MP5). Los resultados se muestran en las Tablas 3.5 a 3.6.

Tabla 3.5. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de AE y partículas NP50)

C_{NP50} (g/L)	C_{AE} (mg /L)	%RES	SD (mg/L)
0	1022.30	100.00	-
0.005	932.09	91.19	7.08
0.01	913.32	89.36	8.54
0.05	870.02	85.32	4.28
0.1	834.00	81.59	3.82

Tabla 3.6. Concentración de AE en sobrenadante (solución acuosa de AE y partículas MP5)

C_{MP5} (g/L)	C_{AE} (mg/L)	%RES
0	997.28	100.00
0.005	965.15	96.78
0.01	942.65	94.52
0.05	918.33	92.08
0.1	935.57	93.81

Las micropartículas de sílice S50 y las nanopartículas de magnetita NP50 a la misma concentración de 0.1 g/L son las que han mostrado una mayor interacción con el tensioactivo no iónico AE por lo que resultan más interesantes a la hora de estudiar la influencia que pueden ejercer sobre la detergencia de soluciones de tensioactivo y partículas. De entre ellas se seleccionaron las partículas de sílice S50 para el estudio de la detergencia por presentar una mayor estabilidad en suspensión hasta concentraciones de 1.0 g/L (se comprobó que las suspensiones de MP y NP de sílice obtenidas según el procedimiento descrito en 2.8.3 no mostraron precipitado alguno hasta 30 minutos después de preparadas) Por el contrario, las partículas de magnetita precipitan con facilidad debido a la alta densidad de las mismas. Esto impide que se establezcan en solución a concentraciones superiores a 0.1 g/L por lo que el estudio de interacción entre los tensioactivos y estas partículas no se llevó más allá de dicha concentración.

3.1.2 Estudio de la eficacia de lavado del almidón seco con formulaciones detergentes que contienen partículas

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.7, se realizaron ensayos de lavado de almidón seco en el dispositivo BSF modificando las variables pH, concentración de partículas Sipernat 50 (CMP) y caudal de recirculación (Q) de acuerdo con la matriz de experimentos generada mediante aplicación de un diseño factorial completo 2^3 (ver apartado 2.8.6). Esa matriz de experimentos se aplicó a tres tipos de formulaciones de lavado:

- **Diseño D1:** Suspensión de micropartículas S50 en solución a pH constante (7, 10 y 13).
- **Diseño D2:** Suspensión de micropartículas S50 en solución de AE 1.0 g/L a pH constante (7, 10 y 13).
- **Diseño D3:** Suspensión de micropartículas S50 en solución de APG 1.0 g/L a pH constante (7, 10 y 13).

En cada ensayo de lavado (procedimiento descrito en 2.7) se tomaron muestras a tiempo inicial, 5, 10, 20, 30 y 45 minutos, evaluándose los resultados de detergencia a cada tiempo de ensayo. En los siguientes apartados se muestran los resultados de las tres matrices de experimentos expresados en función de la variable respuesta, detergencia a tiempo final (De_f , %) de cada experimento individual. Previamente en el apartado 3.1.2.1 se define cómo se evalúa la detergencia a partir de las muestras del baño de lavado extraídas a cada tiempo de ensayo.

Finalmente, en el apartado 3.1.2.3 se muestran los resultados de una serie de ensayos complementarios que se realizaron para completar el estudio de la influencia de las partículas S50 en la detergencia de soluciones pH13, puesto que los máximos de detergencia se encontraron en las soluciones de mayor alcalinidad.

3.1.2.1 Cálculo de la detergencia a partir de los ensayos de lavado

El cálculo de la detergencia (De_t , %) indicado en la Ecuación 2.3 también se puede expresar en función de la concentración de almidón medida en las muestras extraídas del BSF. Así, la detergencia obtenida a cada tiempo se puede calcular como:

$$De_t = \frac{C_{\text{almidón}}}{C_{\text{almidón max}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (3.1)}$$

Donde $C_{\text{almidón}}$ (mg/L) es la concentración de almidón en la solución de lavado a tiempo t . Esta concentración de almidón se determina mediante el método colorimétrico del fenol-sulfúrico, a partir de la absorbancia de la muestra (restando la absorbancia de la solución de lavado a tiempo inicial) y la recta de calibrado (preparada a partir de D-glucosa), el factor de dilución FD y un factor de corrección 0.9 que representa la relación estequiométrica entre almidón y glucosa en la hidrólisis ácida del almidón (Lampitt *et al.*, 1947; Jaiswal y Prakash, 2011) (ver apartado 2.5.2).

$$C_{\text{almidón}} = \frac{Abs_{490} - Abs_{490(t=0)}}{0.009937} \cdot FD \cdot 0.9 \quad \text{Ec. (3.2)}$$

Por otra parte, $C_{\text{almidón max}}$ (mg/L) es la concentración máxima de almidón que podríamos alcanzar si obtuviéramos un 100% de detergencia, teniendo en cuenta que el volumen de solución de lavado es de 0.5 L. La masa de almidón adherido al sustrato se calcula por diferencia de pesada entre las esferas de acero inoxidable sin ensuciar (m_{sustrato}) y una vez ensuciadas y secas ($m_{\text{sustrato sucio}}$) tal y como se indica en la ecuación siguiente:

$$C_{\text{almidón max}} = \frac{m_{\text{sustrato sucio}} - m_{\text{sustrato}}}{0.5} \cdot 1000 \quad \text{Ec. (3.3)}$$

En cada uno de los ensayos de lavado se evaluó la detergencia final mediante dos procedimientos, según se indica en la Ecuación 3.1 y por diferencia de pesada entre la masa de almidón que contienen las esferas antes de iniciar el ensayo y la masa de almidón residual una vez finalizado el experimento (una vez secadas las esferas en estufa durante un mínimo de 12 h). De este modo se comparan los

resultados obtenidos por ambos métodos y se comprueba la bondad de los procedimientos analíticos utilizados. Así, la detergencia por diferencia de pesada se expresaría como:

$$De_{\text{peso45min}} = \frac{m_{\text{sustratosucio}} - m_{\text{sustratolavado}}}{m_{\text{sustratosucio}} - m_{\text{sustrato}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (3.4)}$$

Donde $De_{\text{peso 45 min}}$ es la detergencia evaluada por diferencia de pesada al cabo de los 45 minutos que dura el ensayo, m_{sustrato} es la masa de las esferas de acero inoxidable sin ensuciar, $m_{\text{sustratosucio}}$ es la masa de las esferas sucias antes de comenzar el ensayo y $m_{\text{sustratolavado}}$ la masa de las esferas tras el ensayo de lavado y secadas en estufa.

Para cada experimento propuesto en las matrices D1, D2 y D3 se realizaron un mínimo de tres réplicas.

A continuación se describe de forma detallada el tratamiento de los datos experimentales obtenidos, siguiendo el procedimiento que se acaba de definir para la obtención de los resultados de detergencia correspondientes a cada combinación de factores CMP, pH y Q en los diseños de experimentos D1, D2 y D3. A modo de ejemplo se muestran los resultados del experimento perteneciente al diseño D1 (Baño de lavado - solución pH constante sin tensioactivos): **CMP = 0 g/L, pH = 13, Q = 30 L/h**, que en adelante se identificará como D1-0-13-30.

Tabla 3.7. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, T = 40 °C. Variables: CMP = 0 g/L, pH = 13, Q = 30 L/h. Experimento D1-0-13-30

Tiempo (min)	Abs₄₉₀	C_{almidón} (mg/L)	De_t (%)
Ensayo 1. C_{almidónmax} = 3676.2 mg/L			
0	0.0646	0.00	0.00
5	0.0647	0.91	0.02
10	0.0678	28.98	0.79
20	0.1019	337.82	9.19
30	0.1492	766.22	20.84
45	0.1731	982.68	26.73
Ensayo 2. C_{almidónmax} = 3755.4 mg/L			
0	0.0525	0.00	0.00
5	0.0594	62.49	1.66
10	0.0718	174.80	4.65
20	0.1308	709.16	18.88
30	0.1464	850.45	22.65
45	0.1814	1167.44	31.09
Ensayo 3. C_{almidónmax} = 3841.0 mg/L			
0	0.0546	0.00	0.00
5	0.0578	60.68	1.58
10	0.0725	193.82	5.05
20	0.1144	573.30	14.93
30	0.1422	825.09	21.48
45	0.1682	1060.57	27.61

Para cada experimento se obtuvo la detergencia media de todas las réplicas a cada tiempo ensayado (De) y su desviación estándar (SD). A modo de ejemplo en la Tabla 3.8 y Figura 3.1 se muestran los resultados obtenidos en el experimento D1-0-13-30.

Tabla 3.8. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, T = 40 °C. Variables: CMP = 0 g/L, pH = 13, Q = 30 L/h. Experimento D1-0-13-30. Resultados medios

Tiempo (min)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00
5	0.27	2.34
10	3.50	2.35
20	14.33	4.87
30	21.66	0.91
45	28.48	2.30

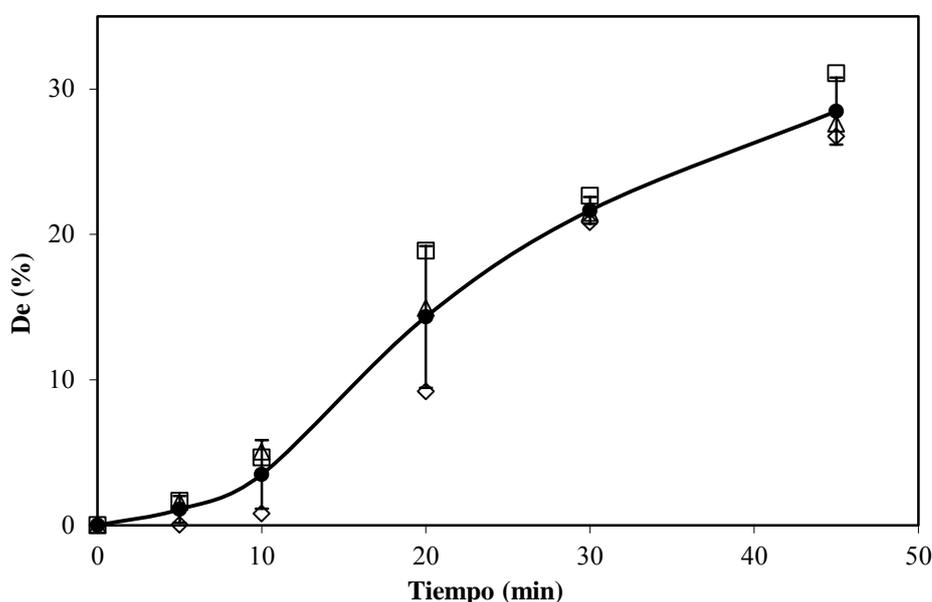


Fig. 3.1. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, T = 40 °C. Variables: CMP = 0 g/L, pH = 13, Q = 30 L/h. Experimento D1-0-13-30. Detergencia en función del tiempo obtenida en las diferentes réplicas del experimento (Ensayo 1 (◇), Ensayo 2 (□) y Ensayo 3 (Δ)). La línea indica la tendencia de la detergencia media (●)

Finalmente, para cada ensayo individual se ha evaluado la masa de las esferas de acero inoxidable limpias (m_{sustrato}), a comienzo del experimento ($m_{\text{sustratosucio}}$) y una vez se produjo el ensayo de lavado ($m_{\text{sustratolavado}}$) lo que permite calcular la $C_{\text{almidónmax}}$ y la detergencia alcanzada al final del proceso. A modo de ejemplo, en la Tabla 3.9 se muestra la detergencia a tiempo final (45 min) obtenida por diferencia de pesada ($De_{\text{peso45min}}$).

Tabla 3.9. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, T = 40 °C. Variables: CMP = 0 g/L, pH = 13, Q = 30 L/h. Experimento D1-0-13-30. Cálculo de la detergencia por diferencia de pesada

	$m_{\text{sustrato}} \text{ (g)}$	$m_{\text{sustratosucio}} \text{ (g)}$	$m_{\text{sustratolavado}} \text{ (g)}$	$De_{\text{peso45min}} \text{ (\%)}$
Ensayo 1	6.5864	8.4245	7.9296	26.92
Ensayo 2	6.6241	8.5018	8.0178	25.78
Ensayo 3	6.6267	8.5472	8.0737	24.66

En todos los experimentos realizados se verifica que la detergencia media obtenida a tiempo final calculada por diferencia de pesada de las esferas es similar a la obtenida analíticamente por determinación con el método fenol-sulfúrico. En el ensayo que se ha utilizado a modo de ejemplo (**D1-0-13-30**) se obtuvieron unos valores medios para la detergencia final de 25.79% (por diferencia de pesada) y 28.48% (por determinación con el método fenol-sulfúrico). Las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

3.1.2.2 Diseño de experimentos para modelización de la detergencia

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.8.6, se realizaron tres series de experimentos (diseños D1, D2 y D3) en los que las variables de diseño (o factores) fueron la concentración de partículas S50 (CMP), el pH y el caudal de recirculación (Q). La variable respuesta es la detergencia a tiempo final (De_f). En las Tablas 3.10 a 3.12 se presentan los resultados obtenidos en estos diseños. En ellas se muestra el número del experimento (Nº Exp.), el orden de ejecución del 1 al 11 (Orden) según el número de experimentos mínimo fijado en la matriz del diseño factorial (ver Tabla 2.12), los valores de los factores y los valores de la variable respuesta. Se muestran todas las réplicas realizadas para cada experimento, así como las variables de operación que se han mantenido constantes en todos los ensayos.

El orden de ejecución se establece al azar, puesto que la distribución aleatoria ayuda a que todas las observaciones estén afectadas por igual por fuentes desconocidas de error y garantiza la independencia de los experimentos (Dean y Voss, 1999). Las réplicas de cada uno de los experimentos se realizaron de forma consecutiva.

Tabla 3.10. Planificación de experimentos para la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Diseño D1

Diseño_D1					
Suciedad_ Almidón gelatinizado y secado					
Sustrato_ Esferas de fibras de acero inoxidable					
Baño de lavado_ Suspensión de S50 en solución a pH 7, 10 o 13					
Temperatura_ 40 °C					
Agitación del baño de lavado_ 60 rpm					
Nº Exp.	Orden	CMP (g/L)	pH	Q (L/h)	Def (%)
1	11	0	7	30	0.19
2	11	0	7	30	0.15
3	8	1	7	30	0.33
4	8	1	7	30	0.88
5	9	0	13	30	26.73
6	9	0	13	30	31.09
7	9	0	13	30	27.61
8	4	1	13	30	27.15
9	4	1	13	30	25.46
10	4	1	13	30	28.79
11	4	1	13	30	25.86
12	4	1	13	30	23.76
13	10	0	7	60	0.12
14	10	0	7	60	0.43
15	3	1	7	60	1.05
16	3	1	7	60	0.35
17	6	0	13	60	37.86
18	6	0	13	60	29.36
19	6	0	13	60	33.73
20	7	1	13	60	20.14
21	7	1	13	60	36.66
22	7	1	13	60	29.54
23	5	0.5	10	45	0.42
24	2	0.5	10	45	1.53
25	1	0.5	10	45	1.14
26	1	0.5	10	45	1.16
27	1	0.5	10	45	0.02
28	1	0.5	10	45	0.51

Es importante la repetición del experimento en el punto central, ya que proporciona al modelo una estimación del error experimental. A partir de esta estimación se pueden evaluar los efectos y verificar la bondad de ajuste del modelo. Además, la adición de puntos centrales a la matriz de experimentos permite

observar posibles efectos de curvatura en el modelo, lo que indicaría la necesidad de añadir algunos términos cuadráticos (Montgomery, 2004).

Tabla 3.11. Planificación de experimentos para la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Diseño D2

Diseño_D2					
Suciedad_ Almidón gelatinizado y secado					
Sustrato_ Esferas de fibras de acero inoxidable					
Baño de lavado_ Suspensión de S50 en solución de AE 1 g/La pH constante					
Temperatura_40 °C					
Agitación del baño de lavado_60 rpm					
Nº Exp.	Orden	CMP (g/L)	pH	Q (L/h)	Def (%)
1	10	0	7	30	0.34
2	10	0	7	30	4.35
3	3	1	7	30	0.39
4	3	1	7	30	0.98
5	6	0	13	30	19.18
6	6	0	13	30	25.72
7	6	0	13	30	19.72
8	6	0	13	30	24.13
9	8	1	13	30	12.54
10	8	1	13	30	14.64
11	8	1	13	30	24.72
12	8	1	13	30	15.45
13	2	0	7	60	0.65
14	2	0	7	60	0.37
15	1	1	7	60	0.20
16	1	1	7	60	0.34
17	11	0	13	60	28.06
18	11	0	13	60	32.22
19	11	0	13	60	27.34
20	11	0	13	60	29.15
21	11	0	13	60	38.90
22	4	1	13	60	22.53
23	4	1	13	60	22.62
24	4	1	13	60	20.90
25	5	0.5	10	45	0.50
26	9	0.5	10	45	0.88
27	7	0.5	10	45	0.12
28	7	0.5	10	45	1.54
29	7	0.5	10	45	0.59
30	7	0.5	10	45	0.75

Tabla 3.12. Planificación de experimentos para la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Diseño D3

Diseño_D3					
Suciedad_ Almidón gelatinizado y secado					
Sustrato_ Esferas de fibras de acero inoxidable					
Baño de lavado_ Suspensión de S50 en solución de APG 1 g/L a pH constante					
Temperatura_40 °C					
Agitación del baño de lavado_60 rpm					
Nº Exp.	Orden	CMP (g/L)	pH	Q (L/h)	De_f (%)
1	6	0	7	30	0.18
2	6	0	7	30	0.34
3	1	0	13	30	23.46
4	1	0	13	30	24.73
5	1	0	13	30	24.87
6	1	0	13	30	25.91
7	1	0	13	30	29.27
8	4	1	13	30	23.11
9	4	1	13	30	24.72
10	4	1	13	30	18.55
11	7	0	7	60	0.89
12	7	0	7	60	0.72
13	2	1	7	60	0.33
14	2	1	7	60	1.20
15	8	0	13	60	29.71
16	8	0	13	60	27.14
17	8	0	13	60	28.27
18	3	1	13	60	39.02
19	3	1	13	60	38.42
20	3	1	13	60	38.36
21	11	0	10	60	0.65
22	10	0.5	10	45	0.05
23	9	0.5	10	45	0.30
24	5	0.5	10	45	0.56
25	5	0.5	10	45	1.28
26	5	0.5	10	45	0.85

3.1.2.3 Influencia de la concentración de partículas sobre la detergencia en suspensiones de pH 13 con y sin tensioactivos no iónicos

El análisis de la detergencia obtenida con los tres diseños de experimentos indica que el pH tiene un efecto decisivo sobre la detergencia, siendo ésta prácticamente nula en soluciones tampón de pH 7 o 10 con independencia de la concentración de S50, el caudal o la presencia de los tensioactivos AE o APG. Sólo cuando la formulación de lavado presenta un pH 13 se obtienen detergencias elevadas. Por este motivo se amplió el estudio de la detergencia obtenida con soluciones de pH 13 que contienen partículas S50 (rango de concentración 0-1.0 g/L).

Para estudiar si los fenómenos de interacción entre las partículas S50 y el tensioactivo, y por tanto sus posibles efectos en la detergencia, se podían detectar a una baja concentración de partículas se realizaron experimentos que incluían una concentración 0.1 g/L de partículas S50. Con esta concentración se realizaron ensayos de lavado adicionales en solución pH 13 y a los dos valores extremos de caudal utilizados en los diseños de experimentos. En la Tabla 3.13 se resumen las condiciones de ensayo de estos experimentos adicionales.

Tabla 3.13. Detergencia de soluciones de tensioactivos y partículas S50 a pH=13. Condiciones de ensayo

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable	
Suciedad: almidón seco	
Agitación: 60 rpm	
Temperatura: 40 °C	
Concentración de S50: 0.1 g/L	
pH:13	
Variables	Valores ensayados
Caudal de circulación (L/h)	30 / 60
Tensioactivo no iónico (1.0 g/L)	Sin tensioactivo / AE / APG

Cada uno de estos experimentos se realizó por triplicado. Por su especial interés en las tablas 3.14 a 3.19 se muestran los resultados de detergencia media (De, %) y desviación estándar (SD, %) en función del tiempo de todos los ensayos de lavado

realizados a pH 13, incluyendo tanto los pertenecientes a los diseños de experimentos D1, D2 y D3 como los experimentos adicionales a CMP = 0.1 g/L. En estos resultados se puede observar la evolución de la detergencia hasta su valor a tiempo final (45 minutos) en función de los factores Q y CMP.

Tabla 3.14. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Sin tensioactivo, Q=30 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.62	0.06	0.11	0.13	2.79	0.28
10	4.85	0.28	2.53	0.50	4.97	0.49
20	16.90	2.80	9.04	2.06	11.22	3.63
30	22.06	0.82	16.17	2.96	16.28	2.66
45	28.48	2.30	24.63	1.81	26.20	1.89

Tabla 3.15. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Sin tensioactivo, Q=60 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	4.41	0.36	4.50	1.86	8.28	0.30
10	7.29	0.12	9.47	1.72	12.35	2.37
20	21.18	0.79	15.94	0.99	21.41	1.35
30	28.37	1.11	26.61	0.50	24.72	0.00
45	33.65	4.25	34.08	3.26	32.11	3.95

Tabla 3.16. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Concentración AE= 1.0 g/L, Q=30 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.75	0.49	3.01	0.55	0.36	0.03
10	1.40	0.48	3.70	0.79	1.85	0.41
20	7.79	0.52	9.30	1.95	5.79	0.69
30	10.48	1.48	12.09	2.12	11.11	2.04
45	22.19	3.23	21.05	1.74	16.84	1.13

Tabla 3.17. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Concentración AE= 1.0 g/L, Q=60 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.52	0.09	3.90	0.96	3.27	0.51
10	5.88	0.08	11.99	2.17	5.14	0.60
20	16.08	1.11	18.02	4.26	13.77	1.01
30	22.81	0.95	22.66	2.88	16.77	0.25
45	31.13	4.73	30.95	2.79	22.02	0.97

Tabla 3.18. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Concentración APG= 1.0 g/L, Q=30 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.84	0.85	2.07	0.52	2.27	0.16
10	6.45	0.76	8.36	0.78	3.57	2.96
20	10.02	0.90	11.53	1.13	8.76	1.48
30	17.76	1.60	17.80	1.50	17.45	1.29
45	25.65	2.20	26.98	2.84	22.13	3.20

Tabla 3.19. Influencia de la concentración de partículas S50 (CMP) sobre la detergencia de soluciones a pH=13. Concentración APG= 1.0 g/L, Q=60 L/h

t, min	CMP = 0 g/L		CMP = 0.1 g/L		CMP = 1 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	2.80	0.18	7.58	0.54	3.69	1.04
10	6.96	0.04	11.10	0.56	8.73	0.22
20	15.61	0.29	25.90	2.04	23.41	0.28
30	23.18	0.56	29.61	1.62	30.56	2.03
45	28.37	1.28	34.39	0.65	38.60	0.37

3.2 Estudio del comportamiento de formulaciones detergentes que contienen α -amilasa en el lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable

En este apartado se muestran los experimentos realizados para evaluar la actividad que muestra la enzima α -amilasa en presencia de tensioactivos con el fin de determinar su estabilidad en las soluciones detergentes que los contienen. También se evalúa la capacidad detergente que presentan formulaciones que contienen α -amilasa en el proceso de lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable. Se ha estudiado la influencia que tiene sobre la detergencia la concentración de enzima, la temperatura y la presencia de tensioactivos, tanto aniónicos como no iónicos.

3.2.1 Actividad de la enzima α -amilasa en presencia de tensioactivos

Se ha determinado la actividad de la enzima α -amilasa en soluciones que contienen distintos tensioactivos, aniónicos y no iónicos, mediante el método DNS descrito en el apartado 2.5.4. Las condiciones utilizadas en el ensayo de actividad (pH 7, 60 °C, concentración de enzima (0.06 g/L), concentración de almidón (2.0 g/L) y tensioactivo (1.0 g/L)) son similares a las utilizadas en los ensayos de lavado realizados en el dispositivo BSF de forma que pueda compararse la actividad que presenta la enzima con la detergencia alcanzada.

En la Tabla 3.20 se muestra la actividad que presenta la enzima en ausencia de tensioactivos (A), así como la actividad en presencia de cada uno de los tensioactivos ensayados (A_T) y la actividad relativa (AR) obtenida como cociente entre A y A_T para cada una de las cinco réplicas realizadas. La definición de unidad de actividad enzimática (U) y su cálculo a partir de los valores de absorbancia medidos según el método DNS se describen en el apartado 2.5.4.1.

Tabla 3.20. Actividad de la enzima α -amilasa en ausencia y presencia de tensioactivos

<p>pH_7 Temperatura_ 60 °C Tiempo de incubación_ 5 minutos Concentración almidón_ 2.0 g/L Concentración enzima_ 0.06 g/L Concentración tensioactivo_ 1.0 g/L</p>			
Tensioactivo	A (U)	A _T (U)	AR (%)
AE (alcohol graso etoxilado)	9.07	8.66	95.51
	8.90	7.99	89.76
	9.18	9.28	101.10
	7.61	6.47	84.97
	7.08	6.77	95.62
APG (alquilpoliglucósido)	9.07	8.90	98.16
	8.90	8.55	96.08
	9.18	10.38	113.04
	7.61	7.29	95.82
	7.08	5.55	78.42
PGE-OE2 (éster de glicerina polietoxilado)	9.07	8.81	97.22
	8.90	8.67	97.39
	9.18	10.10	110.05
	7.61	7.15	93.94
	7.08	7.17	101.37
PGE-OE17 (éster de glicerina polietoxilado)	9.07	9.10	100.43
	8.90	10.58	118.86
	9.18	10.69	116.38
	7.61	7.12	93.58
	7.08	6.42	90.74
ECA-OE3 (ácido alquil éter carboxílico)	9.07	7.43	81.96
	8.90	8.56	96.17
	9.18	9.04	98.48
	7.61	6.88	90.37
	7.08	6.07	85.71
ECA-OE10 (ácido alquil éter carboxílico)	9.07	9.20	101.45
	8.90	9.32	104.70
	9.18	8.67	94.39
	7.61	7.55	99.24
	7.08	7.58	107.26
LAS (lineal alquilbencenosulfonato)	9.07	8.52	93.93
	8.90	8.03	90.20
	9.18	10.43	113.63
	7.61	6.45	84.82
	7.08	6.27	88.61

3.2.2 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable obtenida mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa

En este apartado se presenta la detergencia alcanzada en los ensayos de lavado de almidón seco adherido a esferas de acero inoxidable mediante soluciones que contienen α -amilasa. Se ha estudiado la influencia que tienen dos variables (concentración de enzima (CE) y temperatura (T)) sobre la detergencia (De) a pH 7, valor en el que la enzima presenta una actividad óptima según el fabricante (ver 2.4). También se realizaron ensayos de lavado con soluciones enzimáticas que contenían micropartículas de sílice Sipernat 50 (1.0 g/L) para estudiar la posible interacción enzima-partícula. Los ensayos se han realizado en el dispositivo BSF de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 2.7. La metodología utilizada fue la misma que en los experimentos de lavado realizados con soluciones con micropartículas de sílice. Para cada experimento se realizó un mínimo de tres réplicas.

El tratamiento de los datos experimentales generados en este apartado, así como en el apartado posterior 3.2.3, se realiza siguiendo las mismas pautas de los ensayos de lavado realizados con soluciones que contenían micropartículas (apartado 3.1.2). A modo de ejemplo se muestran los resultados del experimento realizado con una concentración de enzima $CE = 0.06$ g/L y a la temperatura de 60 °C. En la Tabla 3.21 se muestran los valores de detergencia en función del tiempo para cada una de las tres réplicas realizadas, donde:

- $C_{\text{almidónmax}}$ es la concentración de almidón a tiempo cero, calculada a partir de la masa de almidón retenido en cada conjunto de esferas según la Ec. 3.3.
- $C_{\text{almidón}}$ es la concentración de almidón en la solución de lavado en un tiempo determinado, determinada por el método colorimétrico fenol-sulfúrico y calculada mediante la Ec. 3.2.

El cálculo de estos parámetros se ha llevado a cabo según lo descrito en el apartado 3.1.2.1 y los resultados se muestran en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, pH =7. Variables: CE = 0.06 g/L, T = 60 °C.

Resultados experimentales

Tiempo (min)	Abs₄₉₀	C_{almidón} (mg/L)	De_t (%)
Ensayo 1. C_{almidónmax} = 3902.8 mg/L			
0	0.0518	0.00	0.00
5	0.0592	67.02	1.72
10	0.0803	258.12	6.61
20	0.1122	547.04	14.02
30	0.1632	1008.94	25.85
45	0.2035	1373.94	34.87
Ensayo 2. C_{almidónmax} = 4279.6 mg/L			
0	0.0539	0.00	0.00
5	0.0611	65.21	1.52
10	0.0848	279.86	6.54
20	0.1115	521.68	12.19
30	0.162	979.056	22.88
45	0.2357	1646.55	39.18
Ensayo 3. C_{almidónmax} = 4368.6 mg/L			
0	0.0539	0.00	0.00
5	0.0616	69.74	1.60
10	0.0810	245.44	5.62
20	0.1164	566.06	12.96
30	0.1559	923.81	21.15
45	0.2297	1592.21	36.45

En cada experimento se obtuvo la detergencia media De para cada tiempo analizado y su desviación estándar. Para el experimento realizado con CE = 0.06 g/L y T = 60 °C se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 3.22 y la Fig. 3.2.

Tabla 3.22. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, pH =7. Variables: CE = 0.06 g/L, T = 60 °C. Resultados medios

Tiempo (min)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00
5	1.61	0.10
10	6.25	0.55
20	13.05	0.92
30	23.29	2.38
45	36.83	2.18

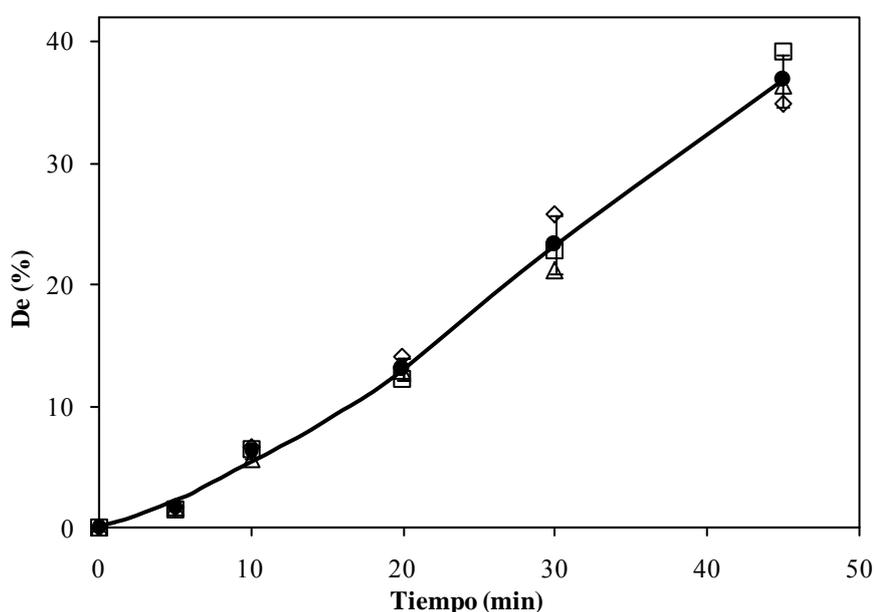


Fig. 3.2. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, pH =7. Variables: CE = 0.06 g/L, T = 60 °C. Detergencia en función del tiempo obtenida en las diferentes réplicas del experimento (Ensayo 1 (○), Ensayo 2 (□) y Ensayo 3 (Δ)). La línea indica la tendencia de la detergencia media (●)

En esta Figura se puede observar que el error experimental (representado por las barras de error) es menor al mostrado en la Figura 3.1, representativa de los ensayos de lavado a pH 13 con partículas. En general la desviación standard entre réplicas en los ensayos con soluciones enzimáticas fue menor a la obtenida entre los ensayos a pH 13 debido a que el baño de lavado con solución enzimática presenta una mayor homogeneidad durante todo el experimento. En los ensayos de lavado con pH 13 se observaban trozos de suciedad desprendidos y suspendidos en el baño

que afectaban a la toma de muestras. Esto se debe sin duda a diferencias en los mecanismos de detergencia que tienen lugar en soluciones alcalinas y enzimáticas.

Finalmente, para cada ensayo individual se han registrado los pesos de las esferas antes de ser ensuciadas, sucias y tras el ensayo de lavado. Estos datos permiten calcular $C_{\text{almidónmax}}$ y por tanto la detergencia mostrada en la Tabla 3.21, así como la detergencia por diferencia de pesada $De_{\text{peso45min}}$, que se muestra en la Tabla 3.23. Este valor se utiliza como comprobación de la detergencia a tiempo final obtenida mediante la determinación de almidón por el método fenol-sulfúrico.

Tabla 3.23. Limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable. Parámetros constantes: Agitación = 60 rpm, pH =7. Variables: CE = 0.06 g/L, T = 60 °C. Cálculo de la detergencia por diferencia de pesada

	$m_{\text{sustrato}} \text{ (g)}$	$m_{\text{sustrato sucio}} \text{ (g)}$	$m_{\text{sustrato lavado}} \text{ (g)}$	$De_{\text{peso45min}} \text{ (\%)}$
Ensayo 1	6.5934	8.5448	7.7867	38.85
Ensayo 2	6.6035	8.7433	7.7425	46.77
Ensayo 3	6.5514	8.7357	7.9057	38.00

Al igual que en 3.1.2.1 se puede comprobar que la detergencia media a tiempo final calculada por diferencia de pesada de las esferas (41.21%, con una desviación standard del 4.84%) es estadísticamente similar a la obtenida mediante la determinación con el método fenol-sulfúrico (36.83%, con una desviación standard del 2.18%).

Siguiendo esta metodología, se llevó a cabo una serie de ensayos de lavado con el fin de determinar la detergencia que presentaban soluciones de α -amilasa (pH 7), estudiando la influencia de las variables CE (0.03 – 1.00 g/L) y T (40-60 °C), manteniendo el resto de parámetros de operación constantes.

Por otro lado, en diversos estudios se ha detectado un posible efecto sinérgico en la detergencia de soluciones enzimáticas cuando la enzima se encuentra inmovilizada por adsorción física en micro- o nanopartículas de sílice (Soleimani *et al.*, 2012,2013) o simplemente cuando enzima y nanopartículas se añaden simultáneamente sobre depósitos de almidón (Lee *et al.*, 2009a). Con el fin de detectar este posible efecto en los ensayos de lavado en BSF se realizó un ensayo con soluciones detergentes que contienen 1.0 g/L de las partículas de sílice Sipernat 50

(S50), CE = 0.06 g/L y T = 60 °C, siguiendo el procedimiento de preparación de la solución de lavado descrito en el apartado 2.7. En la Tabla 3.24 se resumen las condiciones experimentales de todos los ensayos de lavado realizados con soluciones enzimáticas. De todos los experimentos se realizaron al mínimo tres réplicas.

Tabla 3.24. Evaluación de la detergencia que presentan soluciones con α -amilasa. Variables ensayadas

Factores constantes		
Sustrato: Esferas de acero inoxidable		
Suciedad: almidón seco		
Agitación: 60 rpm		
Caudal: 30 L/h		
pH: 7 (tampón fosfato 0.1 M)		
Variables		
Temperatura (T, °C)	Concentración enzima (CE, g/L)	Concentración S50 (CMP, g/L)
40	0.06	0.00
	0.03	0.00
60	0.06	0.00 / 1.00
	0.15	0.00
	1.00	0.00

En las tablas 3.25 a 3.27 se muestran los resultados de detergencia media (De, %) y desviación standard (SD, %) obtenidos en función del tiempo.

Tabla 3.25. Efecto de la concentración de enzima sobre la detergencia en función del tiempo. 40°C

t, min	CE = 0.06 g/L CMP = 0.00 g/L	
	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00
5	0.30	0.08
10	0.89	0.48
20	3.91	0.04
30	8.24	1.11
45	12.34	0.16

Tabla 3.26. Efecto de la concentración de enzima sobre la detergencia en función del tiempo. 60 °C

t, min	CE = 0.03 g/L CMP = 0.00 g/L		CE = 0.06 g/L CMP = 0.00 g/L		CE=0.15 g/L CMP = 0.00 g/L		CE=1.00 g/L CMP = 0.00 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.32	1.35	1.61	0.10	2.96	0.57	20.41	3.07
10	1.80	1.00	6.25	0.55	11.77	4.23	41.11	2.56
20	9.85	1.87	13.05	0.92	21.00	2.89	69.55	4.43
30	15.27	1.27	23.29	2.38	31.36	2.24	88.47	2.69
45	27.13	1.90	36.83	2.18	49.85	0.18	97.02	4.70

Tabla 3.27. Efecto de la concentración de enzima y partículas S50 sobre la detergencia en función del tiempo. 60 °C

t, min	CE = 0.06 g/L CMP = 0.00 g/L		CE = 0.06 g/L CMP = 1.00 g/L	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.61	0.10	1.84	0.41
10	6.25	0.55	4.33	1.91
20	13.05	0.92	13.29	1.08
30	23.29	2.38	20.93	3.24
45	36.83	2.18	39.33	0.54

3.2.3 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable obtenida mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa y tensioactivos

Se ha estudiado el efecto que tiene sobre la detergencia la presencia de tensioactivos en soluciones enzimáticas. Para ello se ha utilizado una concentración de α -amilasa de 0.06 g/L. Esta concentración enzimática se puede considerar representativa de las que se utilizan en máquinas lavavajillas y, en general, en la limpieza de superficies duras (Gormsen *et al.*, 1998). También es consistente con concentraciones de detergentes enzimáticos que poseen la misma enzima comercial (Pitombeira y Cohrs, 2014).

El estudio de la presencia de tensioactivos en las formulaciones enzimáticas se realizó a concentración 1.0 g/L de tensioactivo. Las condiciones experimentales de dichos ensayos se muestran en la Tabla 3.28. Los tensioactivos ensayados, tanto aniónicos como no iónicos, son los mismos que se utilizaron en los ensayos de actividad enzimática (apartado 3.2.1) con el fin de poder establecer una relación entre la detergencia de dichas soluciones y la actividad de la α -amilasa en presencia de estos tensioactivos.

Los valores de detergencia media y desviación standard de las tres réplicas realizadas para cada variable ensayada se muestran en las Tablas 3.29 a 3.31 en las que se indica, por este orden, la detergencia de los ensayos a 40°C y a 60 °C, distinguiendo entre soluciones enzimáticas con tensioactivos no iónicos y aniónicos. De todos los experimentos se realizaron al mínimo tres réplicas.

Tabla 3.28. Evaluación de la detergencia que presentan soluciones enzimáticas en presencia de tensioactivos. Variables ensayadas

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable	pH: 7 (tampón fosfato 0.1 M)
Suciedad: almidón seco	Concentración de α -amilasa (CE): 0.06 g/L
Agitación: 60 rpm	Concentración de tensioactivo (CT): 1.0 g/L
Caudal: 30 L/h	
Tensioactivos utilizados	Temperatura (T, °C)
Alcohol graso etoxilado – AE	40 / 60
Alquilpoliglucósido – APG	40 / 60
Éster de glicerina polietoxilado – PGE-OE2	60
Éster de glicerina polietoxilado – PGE-OE17	60
Ácido alquil éter carboxílico – ECA-OE3	60
Ácido alquil éter carboxílico – ECA-OE10	60
Lineal alquilbencenosulfonato – LAS	60

Tabla 3.29. Influencia de soluciones acuosas que contienen α -amilasa y tensioactivos no iónicos sobre la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable en función del tiempo. 0.06 g/L enzima, 1.00 g/L tensioactivo, 40 °C

t, min	AE		APG	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.01	0.19	0.89	0.26
10	0.63	0.76	1.51	0.02
20	3.81	0.62	4.34	0.49
30	7.27	1.34	7.06	0.39
45	12.25	0.20	12.83	1.03

Tabla 3.30. Influencia de soluciones acuosas que contienen α -amilasa y tensioactivos no iónicos sobre la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable en función del tiempo. 0.06 g/L enzima, 1.00 g/L tensioactivo, 60 °C

t, min	AE		APG		PGE-OE2		PGE-OE17	
	De (%)	SD (%)						
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	2.31	0.40	2.10	0.02	5.05	2.44	3.43	0.19
10	6.81	0.58	7.25	1.11	7.54	1.23	7.40	0.43
20	13.44	1.96	14.74	0.89	18.97	1.21	17.15	0.57
30	19.51	1.75	23.59	0.82	26.53	2.43	24.96	0.34
45	31.85	1.51	34.45	2.95	40.13	2.02	37.70	0.74

Tabla 3.31. Influencia de soluciones acuosas que contienen α -amilasa y tensioactivos aniónicos sobre la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable en función del tiempo. 0.06 g/L enzima, 1.00 g/L tensioactivo, 60 °C

t, min	LAS		ECA-OE3		ECA-OE10	
	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	1.53	0.69	2.14	1.05	2.89	0.17
10	9.09	2.11	6.70	0.59	7.39	0.52
20	17.00	1.21	16.07	0.78	17.62	2.23
30	34.02	1.79	22.56	2.14	25.30	1.42
45	40.43	1.55	29.05	0.40	39.73	3.96

3.3 Procedimiento de limpieza de almidón seco mediante aplicación de corriente continua (electrolimpieza o electrocleaning)

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en los experimentos de limpieza de esferas de acero inoxidable ensuciadas con almidón seco mediante aplicación de corriente continua. Para llevar a cabo estos ensayos se desarrolló un dispositivo (descrito en el apartado 2.9) y un procedimiento experimental mediante el cual se determina la influencia de diversos factores en la eficacia de lavado.

El plan de trabajo se dividió en dos fases: en la primera se analizaron una serie de variables (voltaje, temperatura, tiempo, pH de la solución de lavado, inversión de la polaridad y mojado previo) con el fin de obtener las condiciones de limpieza que podían proporcionar unos resultados óptimos. Una vez determinadas las condiciones óptimas de voltaje, temperatura, tiempo y pH se estudió la influencia que ejercía la presencia de tensioactivos (aniónicos y no iónicos) sobre la detergencia en dichas condiciones. Los resultados de cada una de estas etapas de trabajo se muestran en 3.3.1 y 3.3.2.

3.3.1 Análisis de la influencia de distintas variables en el proceso de lavado mediante electrolimpieza

En primer lugar se evaluó la influencia que ejerce el voltaje utilizado. Se planificaron experimentos de lavado en los que, manteniendo el resto de condiciones de operación constantes, se modificó el voltaje aplicado entre 0 V (sin suministro de corriente, por lo que la limpieza tiene lugar únicamente por inmersión en la solución de lavado) y 10 V, evaluando la detergencia en ensayos de 10 y de 20 minutos de duración. En estos ensayos se mantuvo una temperatura constante de 20 °C. Posteriormente se evaluó la influencia de la temperatura sobre la detergencia, realizando ensayos en un intervalo comprendido entre 10 °C y 60 °C, en ausencia de corriente (0 V) y aplicando un voltaje de 5 V. Los ensayos también se realizaron con una duración de 10 y 20 minutos. Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 3.32 y los resultados se muestran en las Tablas 3.33 a 3.35.

La detergencia se evalúa como el porcentaje de suciedad eliminada del sustrato, y se determina a partir de la masa de sustrato y de la masa de almidón que tiene el sustrato ensuciado antes y después del ensayo de lavado. En cada ensayo se determinó la detergencia para cada una de las cinco esferas de acero inoxidable conectadas en paralelo para su limpieza (ver apartado 2.9).

En todos estos ensayos se utilizó como solución de lavado NaOH pH 13, ya que los procesos de electrolimpieza de superficies metálicas suelen utilizar soluciones alcalinas (Naganuma *et al.*, 1973, Zaki, 2007).

Tabla 3.32. Influencia del voltaje, tiempo de lavado y temperatura sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Condiciones de ensayo

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable	
Suciedad: almidón seco	
Solución de lavado: pH: 13 (NaOH)	
Variables	Valores ensayados
Voltaje aplicado (V)	0 / 1 / 2.5 / 5 / 10
Temperatura (°C)	10 / 20 / 40 / 60
Duración del ensayo (min)	10 / 20

La detergencia media del total de réplicas realizadas (De, %) y la desviación standard (SD) obtenidas para distintos voltajes a pH=13, 20°C y diferentes tiempos se muestran en la Tabla 3.33. Para cada ensayo se realizó un mínimo de tres réplicas.

Tabla 3.33. Influencia del voltaje y tiempo de lavado sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Solución NaOH pH 13, 20 °C

Voltaje (V)	Intensidad media (A)	t=10 minutos		t=20 minutos	
		De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
0	-	28.42	2.55	43.15	6.43
1	0.005	39.92	3.74	48.44	5.96
2.5	0.050	43.43	4.21	52.76	6.24
5	0.257	48.20	2.81	65.65	3.37
10	0.746	65.56	2.78	66.54	4.92

Los resultados obtenidos muestran que la detergencia aumenta progresivamente con el voltaje suministrado hasta los 5 V tanto a tiempos de 10 como de 20 minutos. Sin embargo, al aplicar un voltaje de 10 V durante 20 minutos, la detergencia es similar a la obtenida en el ensayo de 10 minutos. Este valor máximo de detergencia también se puede alcanzar aplicando sólo 5 V durante 20 minutos. Estos resultados llevaron a establecer un voltaje de 5 V como referencia para el estudio de la influencia de la temperatura en el proceso de electrolimpieza.

En las Tablas 3.34 y 3.35 se muestran los resultados de detergencia en función de la temperatura de ensayo, tanto en experimentos sin suministro de corriente como con un suministro de 5 V.

Tabla 3.34. Influencia de la temperatura y tiempo de lavado sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Solución NaOH pH 13, sin suministro de corriente

Temperatura (°C)	Intensidad media (A)	t=10 minutos		t=20 minutos	
		De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
10	-	-	-	-	-
20	-	28.42	2.55	43.15	6.43
40	-	53.09	5.35	55.15	2.51
60	-	58.39	5.13	51.07	4.02

Tabla 3.35. Influencia de la temperatura y tiempo de lavado sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Solución NaOH pH 13, 5V

Temperatura (°C)	Intensidad media (A)	t=10 minutos		t=20 minutos	
		De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
10	0.122	-	-	62.39	6.22
20	0.257	48.20	2.81	65.65	3.37
40	0.333	78.79	8.70	71.07	1.04
60	0.396	71.60	2.49	77.03	2.68

En este trabajo se ha estudiado también la limpieza del almidón seco adherido a las esferas de acero inoxidable con soluciones de lavado de distintos pH, en concreto a valores de pH comprendidos entre 1 y 13, preparadas según se indica en el

apartado 2.8.2 y 2.9. En todos los ensayos se utilizó un voltaje de 5 V, temperatura de 20 °C y duración del ensayo 20 minutos. Las condiciones experimentales y resultados de los experimentos de limpieza se muestran en las Tablas 3.36 y 3.37 respectivamente.

Tabla 3.36. Influencia del pH sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Variables analizadas

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable.	
Suciedad: almidón seco.	
Temperatura: 20 °C.	
Voltaje aplicado: 5 V	
Duración del ensayo: 20 minutos	
Variables	Valores ensayados
pH de la solución de lavado	1 / 7 / 10 / 13

Tabla 3.37. Influencia del pH sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. Solución NaOH pH 13, 5V, 20 °C

		t=20 minutos	
pH	Intensidad media (A)	De (%)	SD (%)
1	0.610	3.67	2.49
7	0.093	0.86	0.48
10	0.575	0.23	0.17
13	0.257	65.65	3.37

El estudio de los factores que influyen en la electrolimpieza del almidón seco sobre acero inoxidable se completó con una serie de experimentos en los que se evaluó la influencia de la inversión de la polaridad y del mojado previo de la suciedad y sustrato con anterioridad a la aplicación de corriente. El experimento de inversión de polaridad consistió en conectar las cinco esferas sucias al ánodo del generador de CC, mientras que el electrodo de referencia se conectaba al cátodo. Los experimentos se realizaron a 5 V con solución de NaOH de pH 13, a 20 °C durante 20 minutos. En la Tabla 3.38 se muestran las condiciones experimentales y los resultados del ensayo. Se incluye también el resultado del ensayo en iguales condiciones experimentales pero realizado con las esferas sucias conectadas al cátodo, para facilitar la comparación de resultados.

Tabla 3.38. Influencia de cambio de polaridad sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua.**Condiciones de ensayo y resultados**

Factores constantes			
Sustrato: Esferas de acero inoxidable.			
Suciedad: almidón seco.			
Temperatura: 20 °C.			
Voltaje aplicado: 5 V			
Duración del ensayo: 20 minutos			
Solución de lavado: pH 13 (NaOH)			
Conexión	Intensidad media (A)	De (%)	SD (%)
Ánodo	0.241	38.50	4.16
Cátodo	0.257	65.65	3.37

Finalmente se estudió si un mojado previo de las esferas sucias en la solución de lavado pH 13 (durante 10 o 20 minutos) antes de aplicar corriente continua mejoraba la limpieza. El almidón en solución acuosa inicia un proceso de hinchamiento (“swelling”) y en condiciones de elevada alcalinidad se rompen los enlaces de hidrógeno intermoleculares del almidón, favoreciendo su solubilidad en agua (Han y Lim, 2004). Todo ello podría provocar el desprendimiento del almidón adherido al acero inoxidable con mayor facilidad si el sustrato se mantiene sumergido en solución alcalina un cierto tiempo previo a la aplicación de la corriente continua. Los experimentos tuvieron lugar a 20 °C con aplicación de un voltaje de 5 V. En la Tabla 3.39 se resumen las condiciones experimentales y los resultados se muestran en la Tabla 3.40.

Tabla 3.39. Influencia del mojado previo sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua.**Condiciones y variables de ensayo**

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable.	
Suciedad: almidón seco.	
Temperatura: 20 °C.	
Solución de lavado: pH: 13 (NaOH).	
Voltaje aplicado: 5 V	
Variables	Valores ensayados
Tiempo de mojado previo (min)	10 / 20
Duración del ensayo (min)	10 / 20

Tabla 3.40. Influencia del mojado previo sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. pH 13, 5 V, 20 °C

Tiempo de mojado previo (min)	Intensidad media (A)	t _{lavado*} =10 minutos		t _{lavado*} =20 minutos	
		De (%)	SD (%)	De (%)	SD (%)
10	0.241	43.87	0.76	55.73	1.80
20	0.240	53.33	1.27	62.41	3.11

*Tiempo de duración del proceso de electrolimpieza

3.3.2 Análisis de la influencia de los tensioactivos en el proceso de electrolimpieza de almidón seco

El estudio de los factores que afectan al proceso de electrolimpieza del almidón seco adherido sobre acero inoxidable condujo al establecimiento de unas condiciones de lavado de referencia, consideradas óptimas en función del coste económico y energético asociado (ver apartado 4.3.1.1). En estas condiciones optimizadas se estudió la influencia que ejerce la adición de tensioactivos no iónicos e iónicos en concentración 1.0 g/L sobre la limpieza.

En la Tabla 3.41 se resumen las condiciones experimentales de estos ensayos, indicándose los tensioactivos utilizados (cuyas principales propiedades aparecen en la Tabla 2.1). En la Tabla 3.42 se muestran la detergencia media y la desviación standard de las tres réplicas realizadas para cada experimento

Tabla 3.41. Influencia de la adición de tensioactivos sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua.

Variables de ensayo

Factores constantes	
Sustrato: Esferas de acero inoxidable	
Suciedad: almidón seco	
Temperatura: 20 °C	
pH: 13 (NaOH)	
Voltaje aplicado: 5 V	
Duración del ensayo: 20 minutos	
Concentración de tensioactivo: 1 g/L	
Tensioactivos ensayados	
Aniónicos	No iónicos
LAS	AE
ECA-OE3	APG
ECA-OE10	PGE-OE2
	PGE-OE17

Tabla 3.42. Influencia de la adición de tensioactivo sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. 20 °C, 5 V, pH 13, concentración de tensioactivo 1.0 g/L

Tensioactivo	Intensidad media (A)	t=20 minutos	
		De (%)	SD (%)
LAS	0.250	72.73	5.30
ECA-OE3	0.253	84.87	1.90
ECA-OE10	0.247	81.11	1.15
AE	0.257	87.71	0.38
APG	0.251	74.17	4.98
PGE-OE2	0.253	88.86	2.28
PGE-OE17	0.251	88.72	4.50

Capítulo 4

Discusión de resultados

4.1 Lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable conformulaciones detergentes que contienen partículas

4.1.1 Interacción entre soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos y partículas

En las Tablas 3.1 a 3.4 se muestra la proporción de tensioactivo residual que queda en el sobrenadante una vez que las suspensiones de partículas de sílice con tensioactivos AE y APG han sido sometidas a centrifugación. En la Figura 4.1 se representan los resultados obtenidos junto con una línea de tendencia para cada conjunto de valores. Las barras representan el intervalo de error de los experimentos realizados.

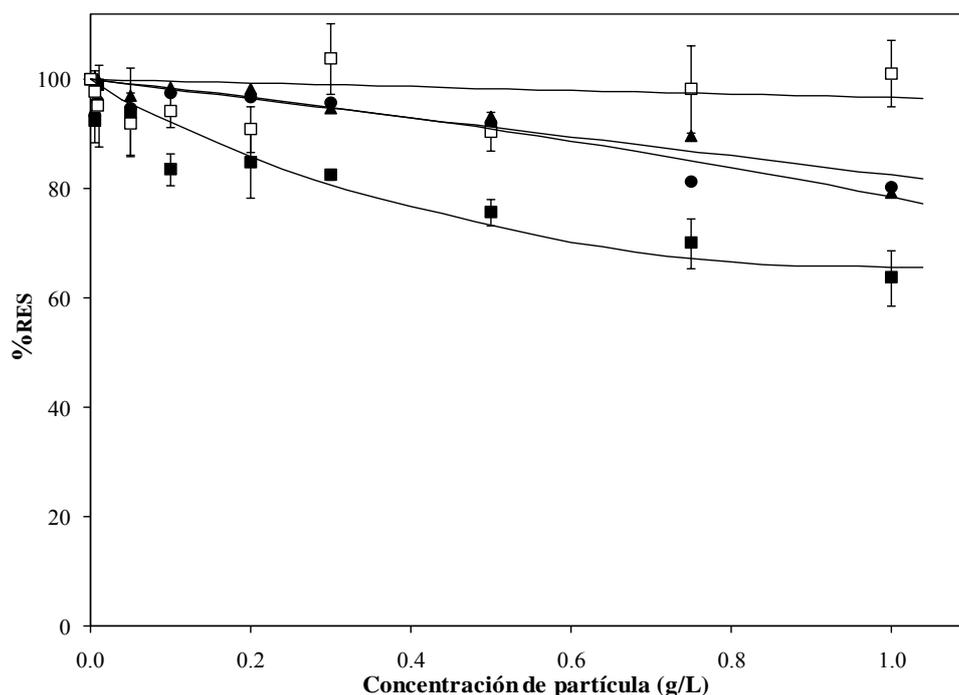


Figura 4.1. Interacción entre soluciones acuosas de AE y APG y partículas de sílice. Influencia de la concentración de partículas sobre el porcentaje de tensioactivo residual (%RES) que queda en el sobrenadante de suspensiones que han sido sometidas a centrifugación. Concentración de tensioactivo en solución = 1 g/L. S50 en AE (■), A200 en AE (▲), A380 en AE (●) y S50 en APG (□)

Se observa que en todas las soluciones de AE se produce un descenso de la concentración de tensioactivo residual en el sobrenadante (%_{RES}) al aumentar la concentración de partículas en suspensión. Este resultado indica que las partículas adsorben al tensioactivo AE en su superficie retirando parte de él de la solución acuosa.

En las suspensiones de las partículas A200 y A380 (partículas A200: tamaño 12 nm, superficie específica 200 m²/g; partículas A380: tamaño 7 nm, superficie específica 380 m²/g) el porcentaje de AE retenido es similar y, para formulaciones que contienen 1.0 g/L de partículas, la cantidad de AE retirado de la formulación es aproximadamente igual al 20% de la cantidad de tensioactivo presente inicialmente. En todo el rango de concentraciones de partículas ensayado se puede observar que la adsorción de tensioactivo alcanzada con las partículas A200 y A380 es menor a la alcanzada con las partículas S50 (partículas S50: tamaño 50000 nm, superficie específica 500 m²/g) de mayor tamaño y mayor superficie específica. Así, para concentraciones de partículas de 1.0 g/L, la adsorción de tensioactivo AE producida por las partículas A200, A380 y S50 son del 21, 20 y 36% de la cantidad de tensioactivo inicial respectivamente (ver Tablas 3.1, 3.2 y 3.3). Esto parece indicar que la superficie específica parece influir significativamente sobre la capacidad de adsorción de la partícula sobre el tensioactivo.

Por otro lado a tenor de los valores de %_{RESNO} se detecta adsorción del tensioactivo APG sobre partículas S50 en el rango de concentraciones estudiado.

Los resultados obtenidos son consistentes con diversas investigaciones que han estudiado la adsorción de tensioactivos no iónicos en superficies de sílice. Así, según Lugo *et al.* (2009) y Kumar *et al.* (2012) los tensioactivos no iónicos cuya fórmula general es C_nE_m , donde E representa la parte hidrofílica compuesta por cadenas de óxido de etileno de un número m de unidades, muestran una fuerte adsorción cooperativa con las partículas de sílice. En esta adsorción juegan un papel importante los enlaces de hidrógeno entre los grupos polares del tensioactivo y los grupos hidroxilo de la superficie sólida (Zhang y Somasundaran, 2006). El tensioactivo no iónico estudiado en este trabajo de investigación es un alcohol etoxilado (AE) cuya fórmula molecular promedio es $C_{12.6}E_{11}$. El comportamiento observado parece indicar un comportamiento similar al mostrado por el tensioactivo no iónico etoxilado utilizado por Kumar *et al.* (2012).

Según Lugo *et al.* (2009) la adsorción que tiene lugar entre el tensioactivo y la superficie de las partículas de sílice se produce en forma de agregados micelares, siguiendo el modelo denominado *micelle decorated*. Estos agregados superficiales adquieren una forma esférica como consecuencia de la pronunciada curvatura superficial de las partículas de sílice lo que impide un empaquetado efectivo de las moléculas de tensioactivo y por tanto la formación de una bicapa.

Para el tensioactivo aniónico SDS, Kumar *et al.* (2012) encontraron que no existía interacción entre las nanopartículas de sílice (cargadas negativamente) y las micelas del tensioactivo, independientemente del tamaño de partícula estudiado. Sin embargo, la fuerte atracción entre las micelas del tensioactivo catiónico DTAB y las nanopartículas de sílice generaba una agregación de nanopartículas caracterizada por una estructura fractal. Sólo en el caso del tensioactivo no iónico decaoxietileno n-dodeciléter (C₁₂H₁₀) las micelas interactuaban con las partículas individuales de sílice, adsorbiéndose sobre su superficie en mayor cantidad cuanto mayor era el tamaño de las partículas.

Por otra parte, los alquipliglucósidos y alquilpolimaltósidos presentan una adsorción muy débil sobre las superficies de sílice (Lugo *et al.*, 2009; Matsson *et al.*, 2004) a diferencia del comportamiento en otras superficies de óxidos metálicos, como el titanio o la alúmina (Zhang y Somasundaran, 2006). Se cree que la forma elipsoidal de las micelas de estos tensioactivos pueden dificultar la adsorción sobre las superficies de sílice (Lugo *et al.*, 2009). En este trabajo, los experimentos de interacción entre las partículas de sílice y el alquilpoliglucósido estudiado proporcionan resultados similares a los reflejados en estos artículos.

Las interacciones observadas pueden influir significativamente en los procesos de lavado que incluyen partículas en la formulación detergente. La adsorción de tensioactivo en la superficie de las partículas podría conducir a una modificación de la detergencia debido a las interacciones físico-químicas que se producen entre las partículas y la suciedad, lo que afectaría a la retirada del sustrato. Por otra parte, las micropartículas también pueden contribuir a la limpieza de superficies por su efecto abrasivo (Pérez-Prat *et al.*, 2013), efecto que puede verse potenciado o reducido debido a la adsorción de tensioactivos.

También se ha estudiado el comportamiento que presenta el tensioactivo AE en presencia de las partículas de magnetita (denominadas MP5 y NP50). En la Figura 4.2 y en las Tablas 3.5 y 3.6 se muestran los resultados obtenidos con las dos partículas estudiadas.

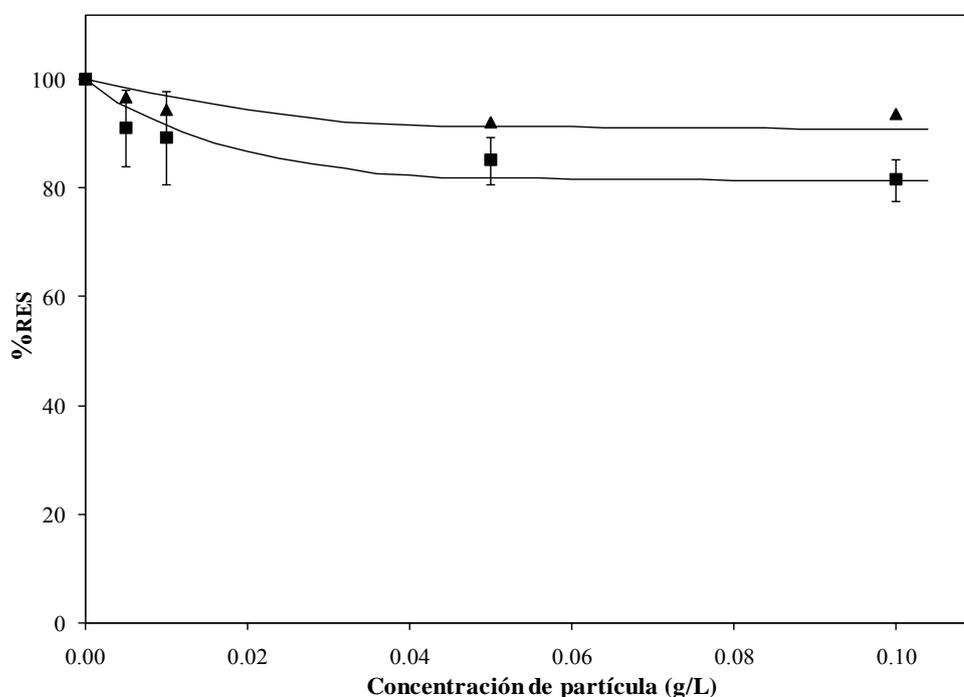


Figura 4.2. Interacción entre soluciones acuosas de AE y partículas de magnetita. Influencia de la concentración de partículas sobre el porcentaje de tensioactivo residual (%RES) que queda en el sobrenadante de suspensiones que han sido sometidas a centrifugación. Concentración de tensioactivo en solución = 1.0 g/L: NP50 (■) y MP5 (▲)

Se puede observar que, en el rango de concentraciones de partículas ensayadas, la adsorción de AE es superior en las nanopartículas NP50 que en las micropartículas MP5 (casi un 20% de tensioactivo adsorbido en las NP50 frente a un 6% en las MP5 a una concentración de partículas de 0.1 g/L). El tamaño de partícula tiene por tanto un papel importante en la adsorción del tensioactivo sobre la magnetita, disminuyendo la cantidad de partículas necesarias para obtener la misma adsorción conforme disminuye también el diámetro medio de las partículas (Borghetti *et al.*, 2011). Según Zhang y Somasundaran (2006) la adsorción de tensioactivos no iónicos sobre óxidos de hierro se produce en forma de bicapa completa sobre la superficie del mineral a concentraciones superiores a la CMC, a diferencia de la adsorción en superficies de sílice, que tiene lugar en forma de agrupación de micelas.

Desde el punto de vista experimental las suspensiones con partículas de magnetita presentaron algunas dificultades. Al presentar una densidad elevada las partículas precipitan en pocos minutos a concentraciones superiores a 0.1 g/L, lo cual dificultaba la estabilización de las suspensiones. Por otra parte, la retirada de las partículas por medio del imán requería un largo periodo de tiempo y no tenía lugar de forma completa. Todo esto dificultó el trabajo con dichas partículas; por ello se optó por utilizar las partículas de sílice S50 (con una alta interacción con el tensioactivo AE) para estudiar el efecto de las partículas sobre la detergencia producida por diversas formulaciones detergentes en el dispositivo BSF.

4.1.2 Estudio de la eficacia de lavado del almidón seco con formulaciones detergentes que contienen partículas de sílice

Siguiendo lo indicado en el apartado 2.8.6, se llevó a cabo un diseño factorial completo 2^3 para estudiar la influencia de los factores concentración de S50 (CMP), pH y caudal (Q) sobre la detergencia alcanzada en BSF con almidón seco adherido sobre acero inoxidable al cabo de 45 minutos. Este diseño se aplicó a tres formulaciones de lavado diferentes (diseño D1, D2 y D3, apartado 3.1.2). A continuación se discuten los resultados obtenidos para cada uno de los tres diseños, presentando los modelos empíricos de ajuste, análisis de la bondad de los modelos y simulación de la detergencia.

4.1.2.1 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D1, suspensión de partículas S50 en solución a pH constante

Este diseño se llevó a cabo utilizando como base para la formulación detergente únicamente solución al pH requerido en cada experimento (7, 10 ó 13). La matriz de experimentos, así como los resultados obtenidos, se muestran en la Tabla 3.10.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Modde 6.0. Por las características del diseño factorial escogido, inicialmente se planeó el ajuste a un modelo lineal con interacción en el que la variable respuesta (De_f) está relacionada con cada uno de los factores (CMP, pH y Q) mediante una función

lineal, más la adición de términos de dependencia o interacción entre variables. Con base a los datos experimentales, se determinaría el valor de los parámetros (β_0 , β_i y β_{ij}) del modelo empírico descrito en la Ecuación 4.1. Generalmente, estos coeficientes se determinan mediante el método de los mínimos cuadrados (Montgomery, 2004).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Ec. (4.1)}$$

Donde ε representa al error del modelo, X representa cada uno de los factores e Y es la variable respuesta. Sin embargo, un análisis previo de los resultados experimentales tanto del diseño D1 como de los diseños D2 y D3 indica la conveniencia de añadir un término más al modelo. Como se ha indicado en el apartado 3.1.2.3, los valores de detergencia dependen fuertemente del pH de la disolución de lavado, siendo prácticamente nula en soluciones de pH 7 y 10 y elevándose significativamente cuando el pH de lavado es 13. Esto indica la necesidad de incorporar un término que describa la relación entre la detergencia y el factor pH en términos de una función cuadrática, pues este comportamiento no puede ser reproducido por una función lineal. El modelo empírico lineal con interacción pero con el término cuadrático para el pH añadido sería el siguiente:

$$\begin{aligned} \text{De}_f = & \beta_0 + (\beta_{\text{CMP}} \text{CMP} + \beta_{\text{pH}} \text{pH} + \beta_Q Q) + \beta_{\text{pH}^2} \text{pH}^2 + \\ & (\beta_{\text{CMP,pH}} \text{CMP} * \text{pH} + \beta_{\text{CMP,Q}} \text{CMP} * Q + \beta_{\text{pH,Q}} \text{pH} * Q) + \varepsilon \end{aligned} \quad \text{Ec. (4.2)}$$

En la Tabla 4.1 se muestra la función polinómica resultante del ajuste de este modelo, expresada tanto en variables de diseño codificadas (escaladas y centradas) como en variables experimentales ensayadas (valores reales). El escalado y centrado de los datos hace posible la comparación de los coeficientes en cuanto a su orden de magnitud. El tamaño de los coeficientes escalados representa el cambio en la respuesta cuando un factor varía de 0 a 1 (en unidades codificadas) mientras que el resto de factores se mantiene en sus valores medios (0 en unidades codificadas). En la Tabla 4.1 también se muestran los valores de los coeficientes R^2 y Q^2 , necesarios para la evaluación de la bondad del modelo. El coeficiente R^2 representa el porcentaje de la variación de la respuesta *explicado* por el modelo, mientras que Q^2 representa el porcentaje de la variación de la respuesta *predicho* por el modelo, por

lo que indica la capacidad del modelo para predecir sobre datos nuevos. Para garantizar la bondad de un modelo ambos coeficientes deben ser próximos a la unidad, tal y como ocurre en el modelo generado para el diseño D1.

Tabla 4.1. Modelo de ajuste del Diseño D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Función polinómica, variables de diseño	R²	Q²
$De_f = 0.797 - 0.373 * CMP + 14.834 * pH + 1.416 * Q + 14.473 * pH^2 - 0.588 * CMP * pH + 0.113 * CMP * Q + 1.364 * pH * Q$	0.985	0.970
Función polinómica, variables ensayadas (CMP: g/L, pH, Q:L/h)		
$De_f = 120.311 + 2.493 * CMP - 28.386 * pH - 0.216 * Q + 1.608 * pH^2 - 0.391 * CMP * pH + 0.015 * CMP * Q + 0.030 * pH * Q$		

Una vez obtenido el modelo se realizan pruebas de hipótesis para asegurar su utilidad. Las pruebas de validación confirman los siguientes supuestos sobre el error del modelo:

- **Normalidad:** El error del modelo sigue una distribución normal ($\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$). La hipótesis de normalidad se puede comprobar a partir del histograma, de un contraste de normalidad o del análisis del gráfico de probabilidad normal de los residuos. Si se utiliza este último método, la distribución de los errores es normal cuando éstos se alinean siguiendo la apariencia de una línea recta. En este gráfico también se puede observar si existen puntos atípicos o anómalos, que son aquellos que se distancian significativamente de la distribución formada por los errores. Si ocurre así, esos puntos se pueden eliminar del modelo y reajustar los parámetros.
- **Independencia:** Los errores deben ser independientes del orden en el que se realizaron los experimentos. Se comprueba mediante un gráfico de los residuos frente al orden temporal. En este gráfico se debería observar una distribución aleatoria de los residuos para asegurar la independencia.
- **Homocedasticidad:** La varianza de los errores debe ser constante ($\text{Var}[\varepsilon] = \sigma^2$). Esta hipótesis se comprueba a partir del gráfico de los residuos

frente a los valores pronosticados. Los puntos deben distribuirse aleatoriamente en torno a cero sin presentar una tendencia concreta.

Se obtuvieron los gráficos de probabilidad normal de los residuos para el Diseño D1 (residuos vs. orden de ejecución y residuos vs. valores predichos por el modelo generado), comprobándose que los errores siguen una distribución normal, con media cero y varianza constante, con lo que se confirmaron las hipótesis sobre la utilidad del modelo (gráficos no mostrados).

En la Tabla 4.2 se muestra el análisis de la varianza (ANOVA) realizado al Diseño D1. El ANOVA divide la variación total de la respuesta (suma de cuadrados) en un componente debido a la regresión del modelo y otro componente debido a los residuos. Si además hay experimentos duplicados (como es el caso del Diseño D1) la suma de cuadrados de los residuos se separa en los debidos al error puro y los causados por el fallo de ajuste.

A partir de este análisis se procede al test de significación de la regresión, cuya prueba se realiza comparando la varianza de la regresión con la varianza del residuo. Cuando el valor del estadístico calculado sea mayor que el valor del estadístico tabulado se acepta la hipótesis de que el modelo no es adecuado para describir los resultados experimentales. Por otra parte, a partir de los resultados de las réplicas para cada experimento se realiza el test del fallo de ajuste (*lack of fit*), que compara el error puro (calculado a partir de los valores de réplica del punto central) y el error debido a la regresión por el modelo mediante un test de la F.

El software Modde 6.0 presenta el resultado de ambos test (significación de la regresión y fallo de ajuste) en términos del p-valor. Estableciendo un intervalo de confianza del 95%, un p-valor menor que 0.05 en el test de significación de la regresión indicará que se acepta la hipótesis de que el modelo de regresión es adecuado para describir los resultados experimentales. Por otra parte, en el test del fallo de ajuste un p-valor mayor que 0.05 indicará que se cumple la hipótesis alternativa, es decir, que el error debido al modelo es similar al error puro y que por tanto no existen indicios de fallo de ajuste. Las cifras del p-valor para ambos test de evaluación de la bondad del modelo demuestran que el modelo generado es altamente adecuado para describir los resultados del Diseño D1.

Tabla 4.2. Análisis de la varianza para el Diseño D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

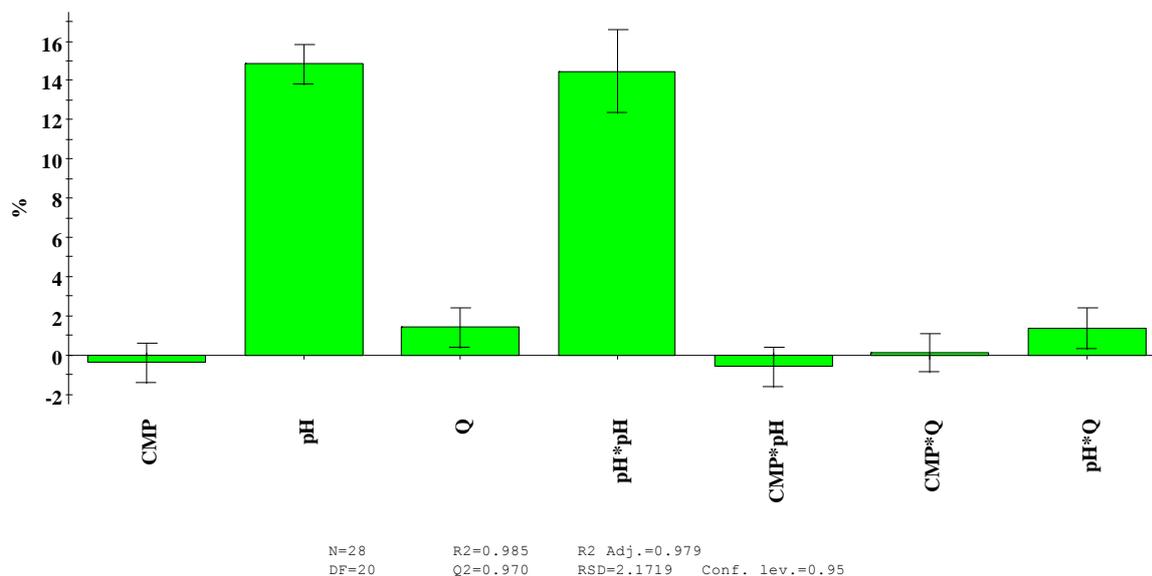
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	p-valor	Desviación estándar
Total	27	6096.37	225.79		15.03
Regresión	7	6002.02	857.43	0.000	29.28
Residuos	20	94.34	4.71		2.17
Fallo de ajuste	1	0.18	0.18	0.852	0.42
Error puro	19	94.17	4.96		2.23

En la Tabla 4.3 y la Figura 4.3 se muestran el test de significación de los coeficientes del modelo y los efectos de cada coeficiente sobre la detergencia, con su correspondiente intervalo de confianza. Un p-valor inferior a 0.05 indica que un coeficiente determinado afecta significativamente a la respuesta (detergencia a tiempo final, en este caso). En el gráfico de efectos de los coeficientes, éstos se representan en su valor escalado y centrado, teniendo significación estadística en el modelo cuando el intervalo de confianza no incluye el cero. Por tanto, a partir de estos resultados se obtiene que los coeficientes que afectan de forma significativa a la detergencia son, por este orden: pH, pH², Q y el término de interacción pH*Q, siendo efectos positivos en todos los casos. Estadísticamente, la presencia de las partículas S50 en un intervalo de concentración entre 0 y 1.0 g/L no influye en la detergencia de soluciones a pH constante.

Tabla 4.3. Test de significación de los coeficientes del modelo para el Diseño D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Coefficiente	p-valor	Int. de confianza (+/-)
Constante	0.379	1.850
CMP	0.451	1.012
pH	0.000	1.012
Q	0.008	1.012
pH²	0.000	2.108
CMP*pH	0.240	1.012
CMP*Q	0.812	0.981
pH*Q	0.011	1.012

Investigation: Tampón factorial CMP 0-1 ordenado (MLR)
Scaled & Centered Coefficients for Detergencia



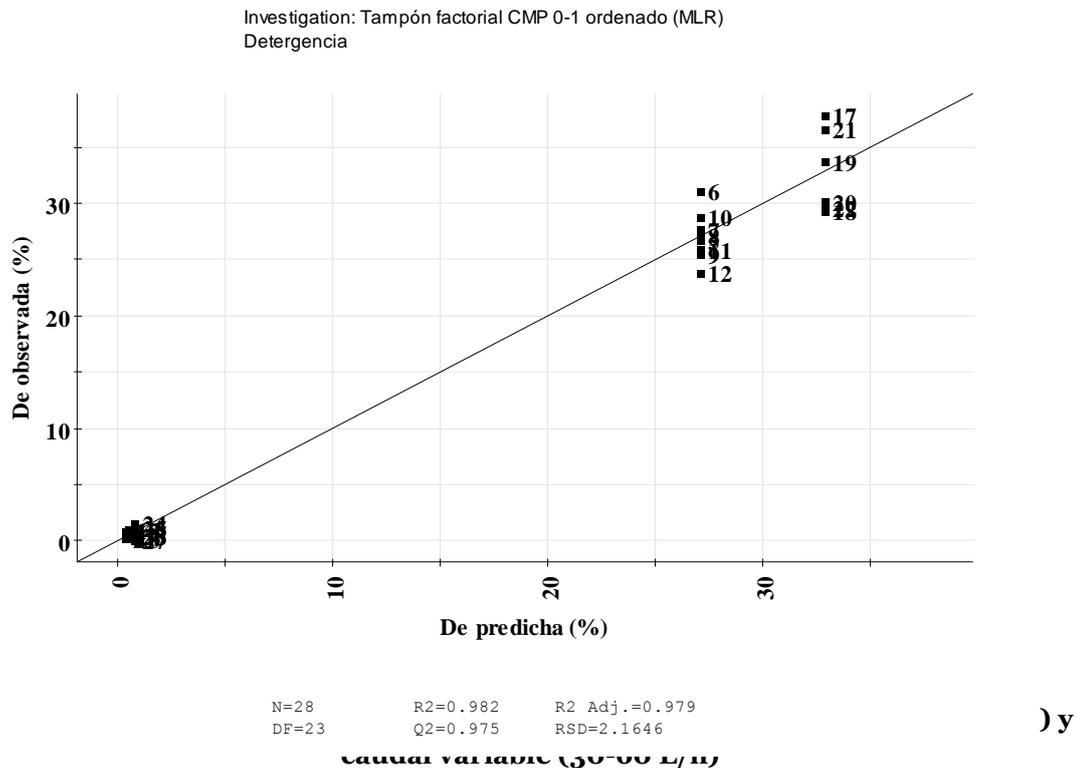
D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Puesto que el modelo obtenido cuenta con varios coeficientes estadísticamente no significativos, podemos excluirlos del modelo inicial propuesto y obtener un modelo simplificado sin perder bondad en el ajuste. Este modelo, expresado en valores reales de las variables, se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Modelo simplificado para el Diseño D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Función polinómica, variables ensayadas (CMP: g/L, pH, Q:L/h)	R²	Q²
$De_f = 120.311 - 28.523 \cdot pH + 1.601 \cdot pH^2 - 0.219 \cdot Q + 0.032 \cdot pH \cdot Q$	0.982	0.975

En la Figura 4.4 se puede observar que existe una relación de coincidencia aceptable entre los valores de detergencia observados y los valores predichos por el modelo, teniendo en cuenta que se considera un buen ajuste de modelo cuando los puntos se alinean en torno a la línea que representa la relación $y=x$. Los números corresponden a cada uno de los experimentos de lavado cuyos resultados se mostraron en la Tabla 3.10 si bien los números correspondientes a los experimentos realizados a pH 7 y pH 10 se superponen al obtener en todos los casos un valor de detergencia próximo a 0.



Por último, en la Figura 4.5 se muestra una gráfica de contorno en la que se muestra el valor de la detergencia a tiempo final (De_f , %) según el modelo polinómico simplificado en función de los factores que se han demostrado estadísticamente significativos, pH y Q. Se puede observar que la influencia del pH es mucho más marcada, siendo necesario utilizar soluciones con pH superior a 10 para obtener un valor de detergencia significativo. Sin embargo, a valores de pH

mayores de 10 se observa un aumento de la detergencia cuando aumenta el caudal, alcanzándose un máximo a pH 13 y 60 L/h, los valores más altos de los dos factores estudiados. En el óptimo la detergencia predicha por el modelo alcanza un valor del 32%.

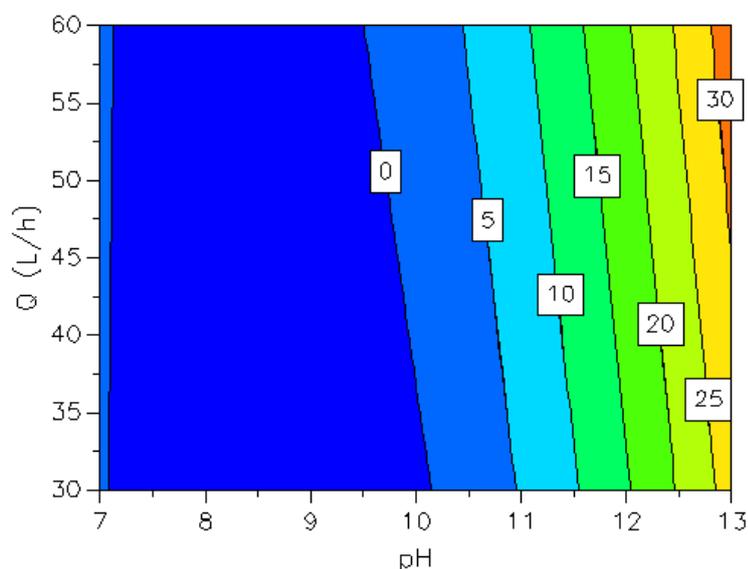


Figura 4.5. Efecto del pH y del caudal sobre la detergencia (De_f , %) en el Diseño D1: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Estos resultados indican que el pH es un factor determinante en la detergencia del almidón seco, puesto que sólo con soluciones fuertemente alcalinas se ha alcanzado un valor de detergencia significativo. El hidróxido sólido y otros álcalis inducen la despolimerización del almidón, especialmente cuando se aplica calor. Este efecto, que conduce a un incremento de la solubilidad, se ha observado en disoluciones acuosas a concentraciones tan bajas como 0.001 M (pH 11) (Jackson *et al.*, 1988). Además, la presencia de NaOH en suspensiones de almidón puede incrementar la concentración de aniones OH^- hasta un nivel que cause un brusco descenso en la viscosidad por ruptura de los enlaces de hidrógeno.

Para explicar la microestructura y propiedades fisicoquímicas que el almidón tiene tras un tratamiento alcalino, Lai *et al.* (2004) sugieren que los iones de la solución alcalina difunden hacia la región amorfa, rica en amilosa, de los gránulos de almidón y causan un mayor hinchamiento de los gránulos con una consecuente exudación de amilosa. En condiciones de elevada alcalinidad se rompen los enlaces de hidrógeno intermoleculares del almidón favoreciéndose su solubilidad en agua

(Han y Lim, 2004) y, por tanto, el lavado de las superficies ensuciadas con almidón. La degradación de la amilosa en soluciones fuertemente alcalinas tiene lugar por ruptura progresiva de los enlaces de hidrógeno que estabilizan las hélices que la conforman, adoptando una configuración más aleatoria. Sin embargo, la amilopectina no es tan susceptible al tratamiento alcalino (Han y Lim, 2004).

Los resultados de los ensayos de lavado indican que la degradación del almidón a valores elevados de pH contribuye de forma fundamental a la eficacia detergente, independientemente de la presencia o no de otros constituyentes en la solución de lavado (tensioactivos, micropartículas, etc.).

Como cabría esperar, la influencia del caudal también es positiva tal y como se deduce del modelo generado (Tabla 4.3) y se observa en la Figura 4.5. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos en los que se ha encontrado una influencia positiva del aumento del flujo de circulación en la limpieza de superficies duras, tanto en el caso de suciedades grasas (Bourne y Jennings, 1963; Jurado *et al*, 2003) como con proteínas lácteas (Bird y Fryer, 1991).

4.1.2.2 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D2, suspensión de partículas S50 en solución de AE a pH constante

En este diseño la formulación detergente estudiada es una solución de 1 g/L de AE, de pH comprendido entre 7 y 13, y partículas Sipernat 50 (S50) en suspensión. Las concentraciones ensayadas en cada experimento son las indicadas en la matriz del diseño factorial elegido (ver Tabla 2.12). Los resultados experimentales, incluyendo todas las réplicas realizadas de cada ensayo, se muestran en la Tabla 3.11. Los experimentos 11 y 21 se eliminaron del ajuste tras el análisis del gráfico de probabilidad normal de los residuos por resultar anómalos. El estudio de este gráfico, junto con el de residuos en función del orden de ejecución y en función de los valores predichos por el modelo permiten confirmar las hipótesis de normalidad, independencia y homocedasticidad del modelo.

En la Tabla 4.5 se muestra la función polinómica resultante del ajuste del Diseño D2, expresada tanto en variables de diseño codificadas (escaladas y

centradas) como en variables experimentales ensayadas (valores reales). Los resultados de los test de significación de la regresión ($p < 0.05$) y del fallo de ajuste ($p > 0.05$) verifican que la función ajustada es significativa al 95% de intervalo de confianza y que es altamente adecuada para describir los datos experimentales. Estos resultados se muestran en la tabla ANOVA (Tabla 4.6).

Tabla 4.5. Modelo de ajuste del Diseño D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Función polinómica, variables de diseño	R ²	Q ²
$De_f = 0.733 - 2.131 \cdot \text{CMP} + 10.474 \cdot \text{pH} + 1.574 \cdot \text{Q} + 10.696 \cdot \text{pH}^2 - 1.657 \cdot \text{CMP} \cdot \text{pH} + 0.258 \cdot \text{CMP} \cdot \text{Q} + 2.137 \cdot \text{pH} \cdot \text{Q}$	0.983	0.969
Función polinómica, variables ensayadas (CMP: g/L, pH, Q:L/h)		
$De_f = 98.586 + 6.225 \cdot \text{CMP} - 22.295 \cdot \text{pH} - 0.308 \cdot \text{Q} + 1.226 \cdot \text{pH}^2 - 0.878 \cdot \text{CMP} \cdot \text{pH} - 0.023 \cdot \text{CMP} \cdot \text{Q} + 0.040 \cdot \text{pH} \cdot \text{Q}$		

Tabla 4.6. Análisis de la varianza para el Diseño D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

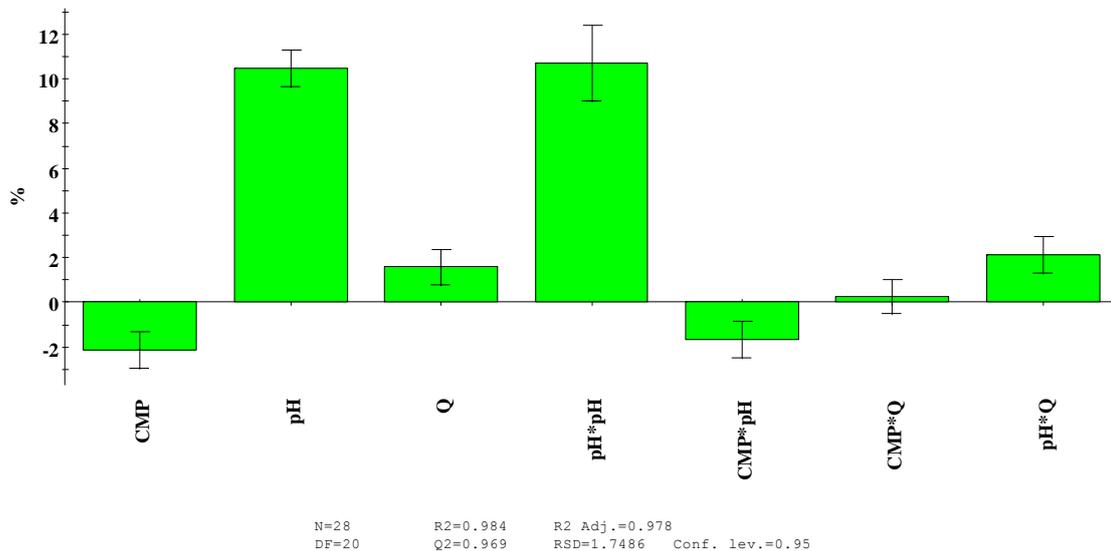
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	p-valor	Desviación estándar
Total	27	3714.04	137.56		11.73
Regresión	7	3652.89	521.84	0.000	22.84
Residuos	20	61.15	3.06		1.75
Fallo de ajuste	1	0.12	0.12	0.851	0.34
Error puro	19	61.04	3.21		1.79

En la Tabla 4.7 y la Figura 4.6 se muestran, respectivamente, el test de significación de los coeficientes del modelo y los efectos de cada coeficiente sobre la detergencia con su correspondiente intervalo de confianza (valores escalados y centrados).

Tabla 4.7. Test de significación de los coeficientes del modelo para el Diseño D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Coefficiente	p-valor	Int. de confianza (+/-)
Constante	0.317	1.489
CMP	0.000	0.811
pH	0.000	0.811
Q	0.000	0.810
pH ²	0.000	1.696
CMP*pH	0.000	1.811
CMP*Q	0.500	0.783
pH*Q	0.000	0.810

Investigation: Findet Factorial CMP 0-1 - ordenado (MLR)
Scaled & Centered Coefficients for Detergencia



D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

De nuevo se obtiene que el pH es el factor más influyente en la detergencia, tanto en término lineal como en término cuadrático. Sin embargo, a diferencia de lo obtenido en el Diseño D1, la concentración de S50 (CMP) y su término de interacción con el pH resultan significativos, con una influencia negativa sobre la detergencia. Al igual que en Diseño D1, el caudal (Q) y su término de interacción con el pH mantienen la significación, con influencia positiva. Se puede indicar que parte de la influencia de Q y de CMP está condicionada por el valor del pH, manifestándose su influencia en la detergencia sólo a partir de valores de pH altos que posibiliten una detergencia superior a cero, de ahí la significación de los

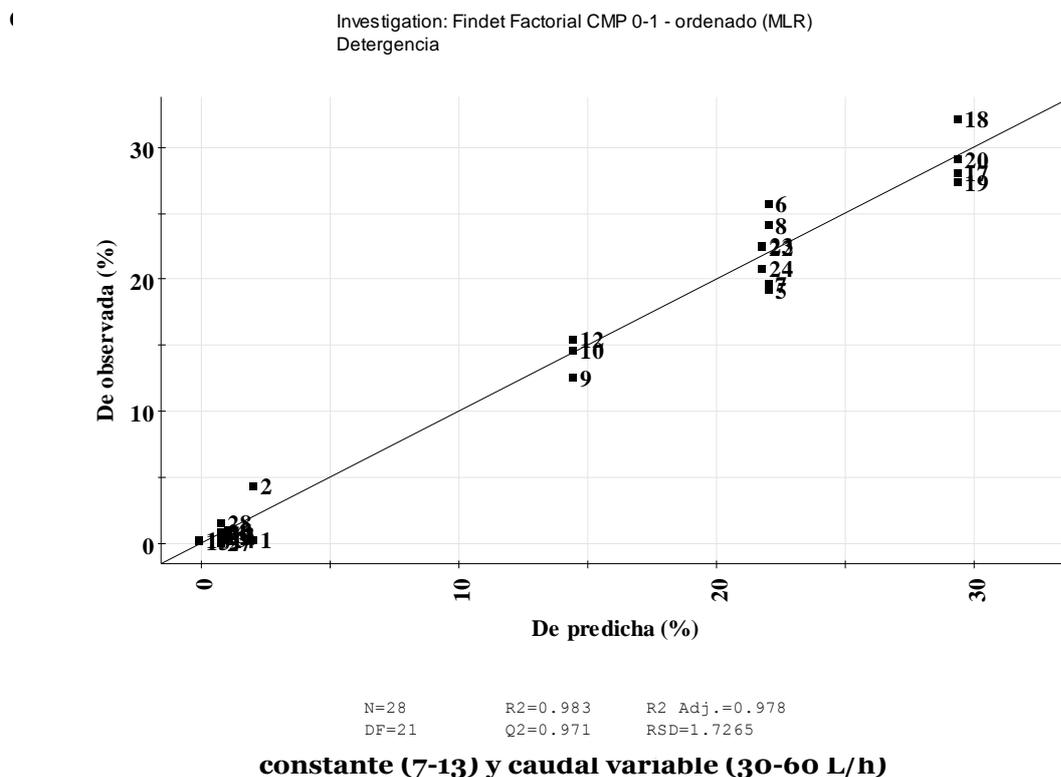
coeficientes de interacción del pH con ambos factores. El término de interacción entre CMP y pH, que tiene significación negativa, indica que se producirá un aumento de la detergencia cuando ambos factores se modifiquen simultáneamente en direcciones opuestas (Lazić, 2004). En los resultados obtenidos queda patente que esto ocurre cuando CMP desciende y el pH aumenta.

El modelo propuesto sólo cuenta con un término no significativo que se puede eliminar para obtener un modelo simplificado, el cual se muestra en la Tabla 4.8 en función de variables reales (ensayadas):

Tabla 4.8. Modelo simplificado para el Diseño D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

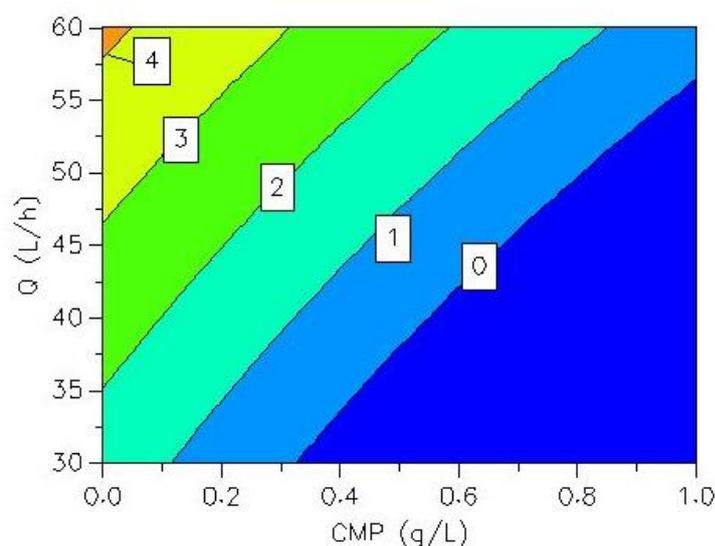
Función polinómica, variables ensayadas (CMP: g/L, pH, Q:L/h)	R²	Q²
$De_f = 97.788 + 6.785 * CMP - 21.844 * pH - 0.370 * Q + 1.188 * pH^2 - 1.105 * CMP * pH + 0.047 * pH * Q$	0.983	0.971

En la Figura 4.7 se representan los valores experimentales frente a los predichos para todos los ensayos realizados, observándose la necesaria



La variación de la detergencia con las variables CMP y Q se representa en la Figura 4.8 para los valores de pH 10 (a) y pH 13 (b). De esta forma se muestra el rango de pH en el que la eficacia detergencia es superior a cero. En ambos gráficos se observa el efecto negativo de la concentración de S50. A pH 10 y CMP = 1.0 g/L la detergencia obtenida es prácticamente cero independientemente del caudal de trabajo mientras que cuando CMP = 0 se obtiene el mayor valor de detergencia, un 4%, al caudal máximo de 60 L/h. A pH 13 se obtiene un valor de detergencia máxima del 29% al máximo caudal ensayado (60 L/h) cuando la solución de lavado no contiene partículas S50. Si la solución de lavado contiene 1.0 g/L de S50, la detergencia a 60 L/h desciende a un 22%. Por lo tanto los valores de los factores que proporcionan la máxima detergencia serán pH = 13, CMP = 0 g/L, Q = 60 L/h. La detergencia máxima predicha por el modelo es del 29%, ligeramente inferior a la obtenida en el Diseño D1 en las mismas condiciones, que fue del 32%. Esto indica que la adición de AE en concentración 1 g/L no mejora la detergencia con respecto a la obtenida sólo con solución tampón pH 13, independientemente de la presencia o no de partículas S50 en la solución de lavado. Este resultado coincide con los obtenidos por Jurado *et al.* (2015) en ensayos de lavado de almidón seco con soluciones acuosas de diversos tensioactivos no iónicos. Ninguno de los tensioactivos ensayados aumentaba significativamente la detergencia con respecto a la obtenida sólo con agua.

(a) pH 10



(b) pH 13

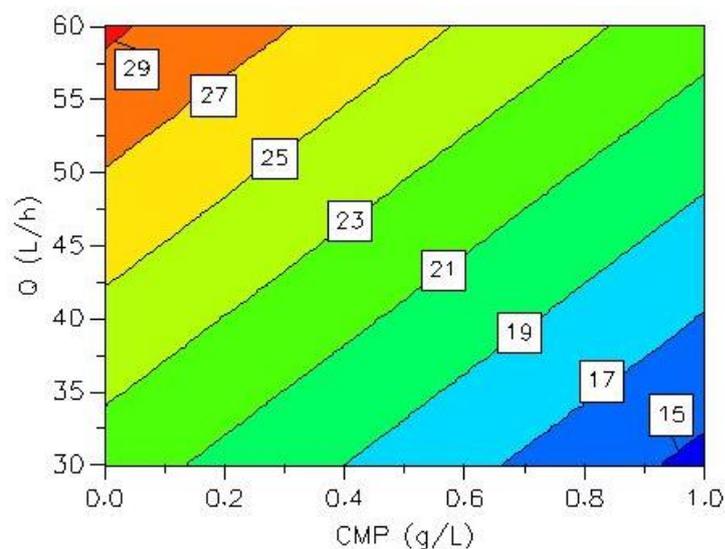


Figura 4.8. Efecto de la concentración de S50 y del caudal sobre la detergencia (De_r , %) a pH 10 (a) y pH 13 (b) en el Diseño D2: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de AE (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

En estos gráficos queda reflejada la influencia negativa que la concentración de S50 tiene sobre la detergencia en soluciones de AE de concentración 1.0 g/L. Esta influencia parece estar relacionada con la adsorción de AE que tiene lugar sobre la superficie de las partículas S50 (descrita en el apartado 3.1.1), que provoca que en soluciones de S50 de 1.0 g/L se produzca un descenso de hasta un 36% en la concentración de tensioactivo en el sobrenadante. Esta adsorción, en vez de causar un efecto positivo sobre la eficacia detergiva al favorecer un contacto más directo

entre tensioactivo y suciedad, supone un impedimento a la acción del tensioactivo, que se traduce en una reducción en la eficacia de lavado.

De igual manera, no se observan efectos positivos sobre la detergencia tal y como Wasan y Nikolov (2003) indican también para la limpieza de suciedades grasas adheridas a superficies duras. Estos autores planteaban que la utilización de nanofluidos (suspensiones de nanopartículas) favorecería la retirada de la suciedad grasa por medio de un aumento de presión en la región de contacto entre las tres fases (superficie dura, grasa y suspensión acuosa) debido a una reordenación de las partículas en dicha región en forma de cristal coloidal. La capacidad de adhesión del almidón seco al acero inoxidable, especialmente tras un tiempo de secado al aire (Liu *et al.*, 2006b), puede impedir que se observe este efecto para el tipo de suciedad y de sustrato utilizados en este trabajo.

4.1.2.3 Aplicación del diseño de experimentos a la modelización de la detergencia: Diseño D3, suspensión de partículas S50 en solución de APG a pH constante

Por último se estudió la eficacia detergiva de soluciones de 1 g/L de APG preparadas en soluciones de pH de rango 7 a 13 y con una concentración de partículas S50 comprendida entre 0-1.0 g/L. Los resultados experimentales completos se muestran en la Tabla 3.12. Al igual que en los Diseños D1 y D2, se estudió el gráfico de probabilidad normal de los residuos así como el de residuos en función del orden de ejecución y residuos en función de los valores predichos por el modelo para confirmar las hipótesis de normalidad, independencia y homocedasticidad del modelo ajustado (ver descripción en 4.1.2.1).

La función polinómica de ajuste, expresada tanto en variables codificadas como en variables ensayadas, se muestra en la Tabla 4.9. También se muestran los resultados de los test de significación de la regresión ($p < 0.05$) y del fallo de ajuste ($p > 0.05$), que verifican que la función ajustada es significativa al 95% de intervalo de confianza y que es altamente adecuada para describir los datos experimentales. Estos resultados se muestran en la tabla ANOVA (4.10).

Tabla 4.9. Modelo de ajuste del Diseño D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Función polinómica, variables de diseño	R ²	Q ²
$De_f = 0.374 - 0.756 \cdot CMP + 15.732 \cdot pH + 4.121 \cdot Q + 12.581 \cdot pH^2 + 2.482 \cdot CMP \cdot pH + 3.437 \cdot CMP \cdot Q + 0.631 \cdot pH \cdot Q$	0.991	0.983
Función polinómica, variables ensayadas (C: g/L, pH, Q:L/h)		
$De_f = 101.007 - 38.678 \cdot CMP - 24.172 \cdot pH - 0.095 \cdot Q + 1.398 \cdot pH^2 + 1.655 \cdot CMP \cdot pH + 0.458 \cdot CMP \cdot Q + 0.014 \cdot pH \cdot Q$		

Tabla 4.10. Análisis de la varianza para el Diseño D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

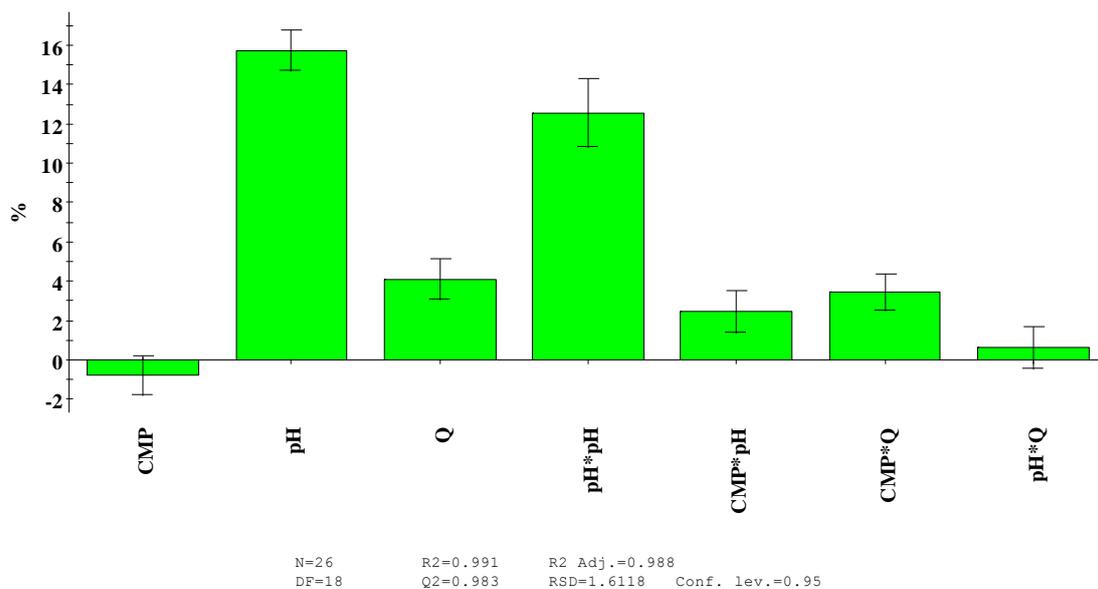
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	p-valor	Desviación estándar
Total	25	5449.65	217.99		14.76
Regresión	7	5402.88	771.84	0.000	27.78
Residuos	18	46.76	2.60		1.61
Fallo de ajuste	1	1.93	1.93	0.404	1.39
Error puro	17	44.83	2.64		1.62

En la Tabla 4.11 y la Figura 4.9 se muestran, respectivamente, el test de significación de los coeficientes del modelo y los efectos de cada coeficiente sobre la detergencia a tiempo final (De_f , %), con su correspondiente intervalo de confianza. En esta figura se representan los valores de las variables escalados y centrados.

Tabla 4.11. Test de significación de los coeficientes del modelo para el Diseño D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Coefficiente	p-valor	Int. de confianza (+/-)
Constante	0.582	1.404
CMP	0.129	0.997
pH	0.000	1.033
Q	0.000	1.044
pH ²	0.000	1.713
CMP*pH	0.000	1.073
CMP*Q	0.000	0.927
pH*Q	0.213	1.028

En la Tabla 4.11 se observa que, a diferencia de los resultados obtenidos en el Diseño D1 y D2, el factor de interacción pH*Q no tiene una influencia significativa sobre la detergencia, mientras que los factores pH, pH² y Q sí mantienen su significación en este diseño. Como se puede observar en la Figura 4.9, el factor pH en forma lineal y cuadrática causa los efectos más importantes. Por otra parte, la concentración de S50 no tiene significación estadística en el modelo ajustado, sin embargo sus términos de interacción con pH y Q sí que tienen una contribución significativa y positiva en la detergencia. Ningún factor en este modelo tiene un efecto negativo sobre la variable respuesta.



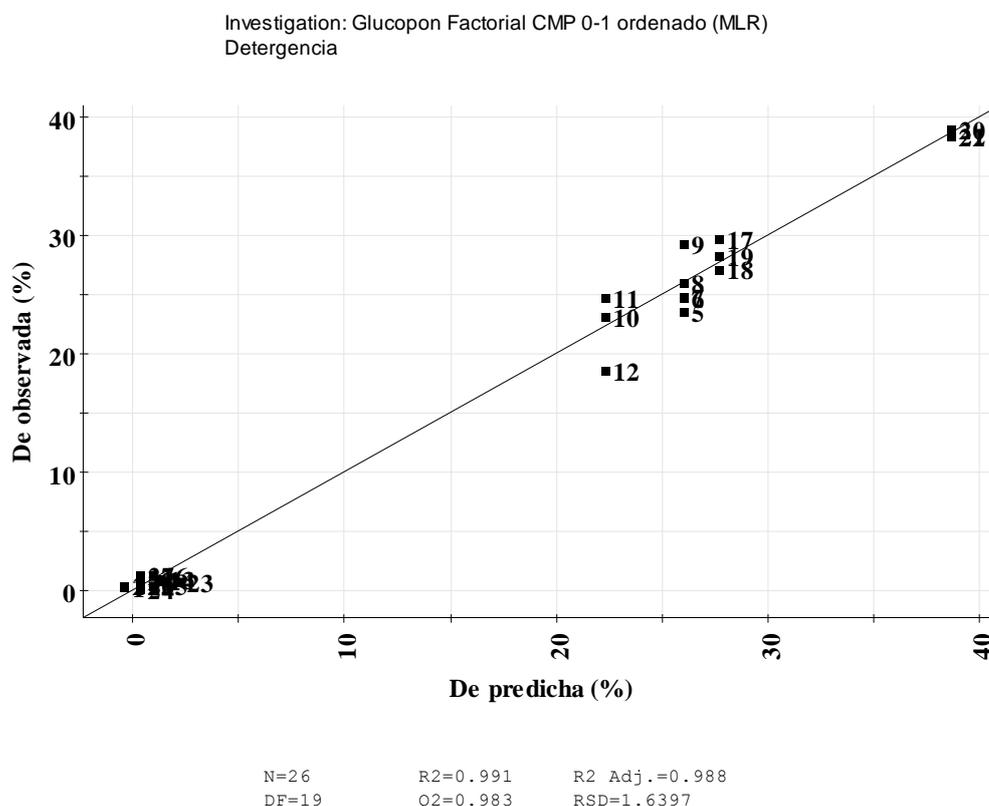
D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

En este modelo se podrían eliminar los términos no significativos pH*Q y CMP para obtener un modelo simplificado. Sin embargo, la eliminación del factor CMP provoca un fallo de ajuste del modelo (p-valor del test *lack of fit* < 0.05) al tener como consecuencia la eliminación de sus términos de interacción con pH y Q para preservar la jerarquía del modelo. Puesto que estos términos tienen una significación importante en el modelo, se ha optado por mantener CMP en la ecuación de ajuste y eliminar únicamente pH*Q. La expresión del modelo simplificado se muestra en la Tabla 4.12 en función de variables reales.

Tabla 4.12. Modelo simplificado para el Diseño D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

Función polinómica, variables ensayadas (CMP: g/L, pH, Q:L/h)	R²	Q²
$De_f = 91.643 - 42.775 * CMP - 22.970 * pH + 0.056 * Q + 1.368 * pH^2 + 1.876 * CMP * pH + 0.489 * CMP * Q$	0.991	0.983

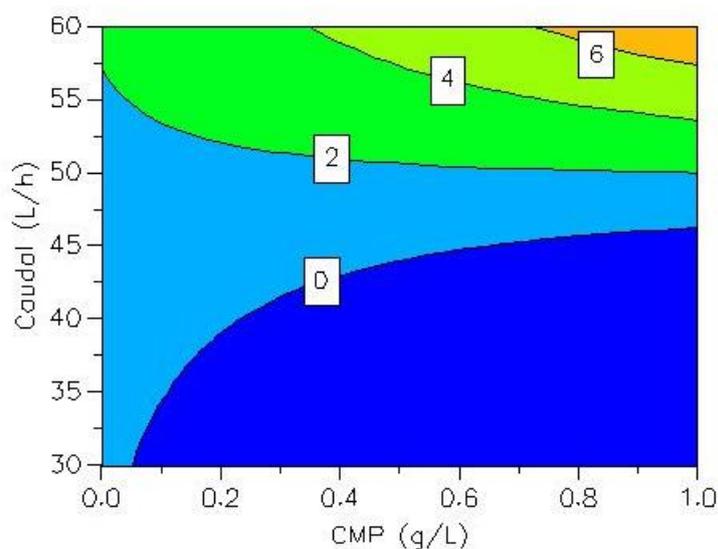
En la Figura 4.10 se representan los valores experimentales frente a los predichos para todos los ensayos realizados, pudiéndose comprobar que existe



En la Figura 4.11 se muestra la variación de la detergencia con los factores CMP y Q en soluciones de APG de 1.0 g/L en tampón pH 10 (a) y pH 13 (b). En las soluciones de APG la influencia de la concentración de S50 es diferente a lo observado para las soluciones de AE (Diseño D2). Mientras que en aquéllas la CMP tenía un efecto claramente negativo sobre la detergencia, en el Diseño D3 se ha observado que este factor no es significativo por sí solo. Sin embargo, en la Figura 4.11 se observa el efecto de interacción entre la CMP y el caudal. A valores por encima de 40-45 L/h la detergencia se incrementa significativamente al aumentar CMP, llegando a un máximo del 7% en las soluciones de pH 10 y del 38% en las soluciones de pH 13. De nuevo, el óptimo de detergencia se obtiene a los valores máximos de los tres factores estudiados: pH 13, CMP = 1.0 g/L, Q = 60 L/h. Este valor es el más alto obtenido en los tres diseños experimentales realizados. Por tanto, la adición de tensioactivo APG a la suspensión de micropartículas de sílice es la mejor opción de las estudiadas para el lavado de almidón seco adherido a las esferas de acero inoxidable.

El almidón tiene una tendencia mayor a unirse a moléculas de APG que a tensioactivos no iónicos etoxilados (Bravo *et al.*, 2008; Martínez-Gallegos *et al.*, 2011). Siendo la formación de complejos un fenómeno que puede mejorar el rendimiento detergente por aumento de la solubilización de las cadenas poliméricas (Goddard, 1986), el aumento de la detergencia obtenido para soluciones con APG puede deberse a la formación de complejos con el almidón que, por otra parte, no se ve impedida por la presencia de las partículas pues no presenta interacciones de ningún tipo con éstas.

(a) pH 10



(b) pH 13

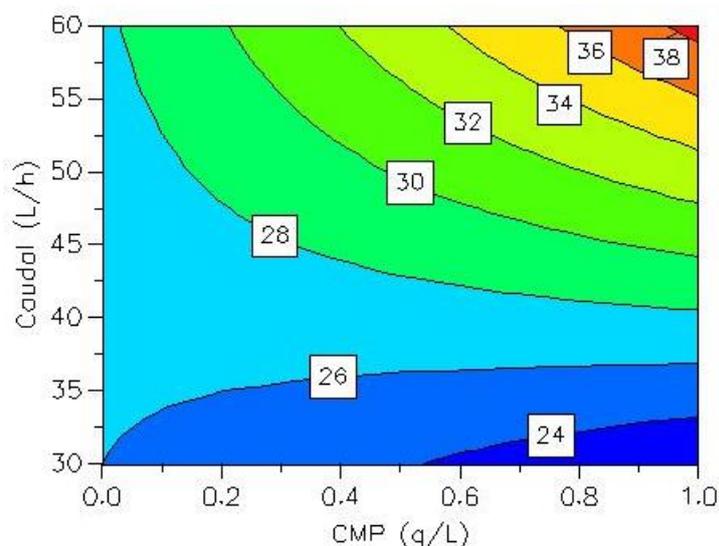


Figura 4.11. Efecto de la concentración de S50 y del caudal sobre la detergencia (De_r , %) a pH 10 (a) y pH 13 (b) en el Diseño D3: suspensión de partículas S50 (0-1 g/L) en solución de APG (1 g/L) a pH constante (7-13) y caudal variable (30-60 L/h)

A partir del análisis de los tres modelos de ajuste se puede concluir que la presencia de micropartículas S50 afecta a la modelización de la detergencia de almidón seco con soluciones de tensioactivos no iónicos en solución pH 10 y pH 13. En dichas soluciones, en ausencia de tensioactivo la detergencia es función únicamente del pH y del caudal, sin que las partículas tengan efecto significativo. Sin embargo, en soluciones que contienen AE o APG, la detergencia depende de la concentración de partículas S50, teniendo éstas una influencia negativa en las

soluciones que contienen AE y una influencia positiva en las soluciones que contienen APG condicionada a valores altos de caudal.

4.1.2.4 Influencia de la concentración de partículas sobre la detergencia en suspensiones de pH 13 con y sin tensioactivos no iónicos

En los apartados anteriores se ha mostrado la modelización de la detergencia a tiempo final del ensayo (De_f) para los tres diseños de experimentos propuestos. No obstante, los ensayos de lavado en el dispositivo BSF proporcionan además información sobre la evolución de la detergencia con el tiempo de lavado cuyos resultados conviene analizar. En los siguientes gráficos se pueden observar los perfiles detergencia/tiempo para cada ensayo y la influencia que ejercen las variables CMP, pH y Q. Se ha centrado el análisis en los ensayos realizados con solución pH 13 con o sin tensioactivos no iónicos (AE y APG), ya que proporcionaron los mayores valores de detergencia. Los ensayos de lavado a pH 13 contenidos en los diseños de experimentos D1 a D3 se completaron con ensayos adicionales utilizando soluciones con una concentración de partículas S50 de 0.1 g/L, mostrándose los resultados en el apartado 3.1.2.3 (Tablas 3.14 a 3.19).

La fuerte influencia del pH de la disolución de lavado sobre la detergencia a tiempo final ha quedado reflejada en los modelos generados a partir de los diseños de experimentos D1 a D3 (apartados 4.1.2.1 a 4.1.2.3). Se puede observar igualmente en los perfiles de detergencia en función del tiempo obtenidos para las tres disoluciones estudiadas, pH 13, pH 13 + AE 1.0 g/L y pH 13 + APG 1.0 g/L. A modo de ejemplo, en la Fig. 4.12 se muestran los perfiles detergencia/tiempo de soluciones a pH 7 (CMP = 0 g/L, Q = 30 L/h), pH 10 (CMP = 0.5 g/L, Q = 45 L/h, condiciones del punto central en los diseños experimentales realizados) y pH 13 (CMP = 0 g/L, Q = 30 L/h). Las barras de error representan el intervalo $\pm SD$ obtenido con al menos tres repeticiones de cada experimento. Tanto a pH 7 como a pH=10 la detergencia es prácticamente cero en el rango experimental ensayado. A pH 13 la detergencia aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor próximo al 30% al cabo de 45 min. El perfil muestra una primera etapa con una velocidad de lavado menor (hasta 5-10 min) para posteriormente aumentar la detergencia con el tiempo de forma prácticamente lineal hasta los 30 minutos. Superado este tiempo se reduce la

pendiente de velocidad en el tramo final del experimento. Este patrón se repite en gran número de los experimentos realizados.

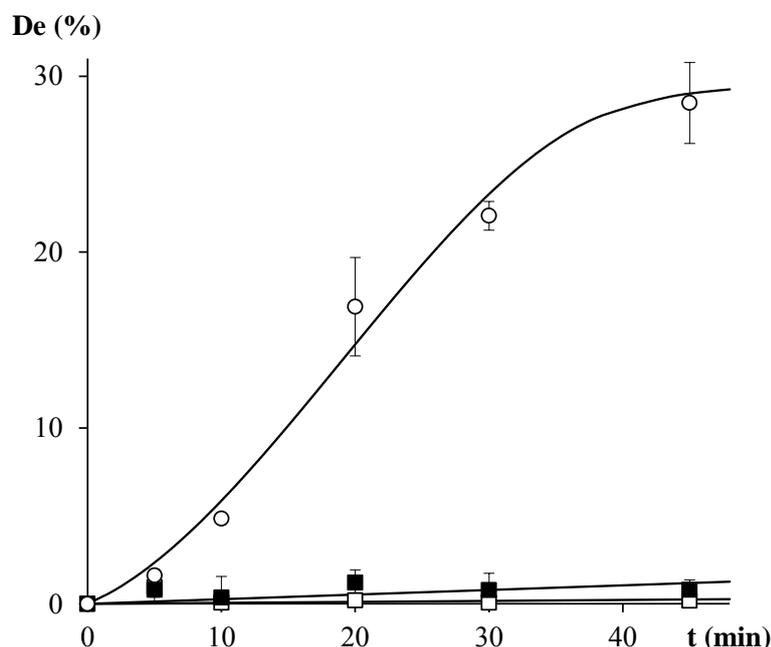


Fig. 4.12. Influencia de pH y tiempo sobre la detergencia de almidón. a) pH 7, CMP = 0 g/L, Q = 30 L/h (□), b) pH 10, CMP = 0.5 g/L, Q = 45 L/h, (■), c) pH 13, CMP = 0 g/L, Q = 30 L/h (○)

El caudal es el segundo factor que ejerce un gran efecto sobre la detergencia en los tres diseños de experimentos estudiados. En soluciones pH 13, con o sin tensioactivos AE o APG, un aumento en el caudal desde 30 a 60 L/h (manteniendo el resto de variables de ensayo constantes) conlleva un aumento de la detergencia comprendido entre un 11 y un 74%. A modo de ejemplo, en la Figura 4.13 se muestran los perfiles de detergencia en función del tiempo de soluciones de pH 13 con 0.1 g/L de S50 y con caudales de recirculación de 30 y 60 L/h. Se observa que los valores de detergencia a 60 L/h son superiores desde los primeros minutos de ensayo aumentando progresivamente la distancia con respecto a la detergencia alcanzada a 30 L/h y obteniéndose un valor a tiempo final un 38% superior al obtenido con el valor de caudal inferior. Se confirma por tanto que el caudal de circulación es un factor decisivo en la detergencia del almidón seco. Velocidades de flujo mayores pueden incrementar la retirada de suciedad del sustrato por arrastre mecánico y además impedir su redeposición en el transcurso de los ciclos de lavado (Bird y Fryer, 1991; Jurado *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 1992; Otto *et al.*, 2014).

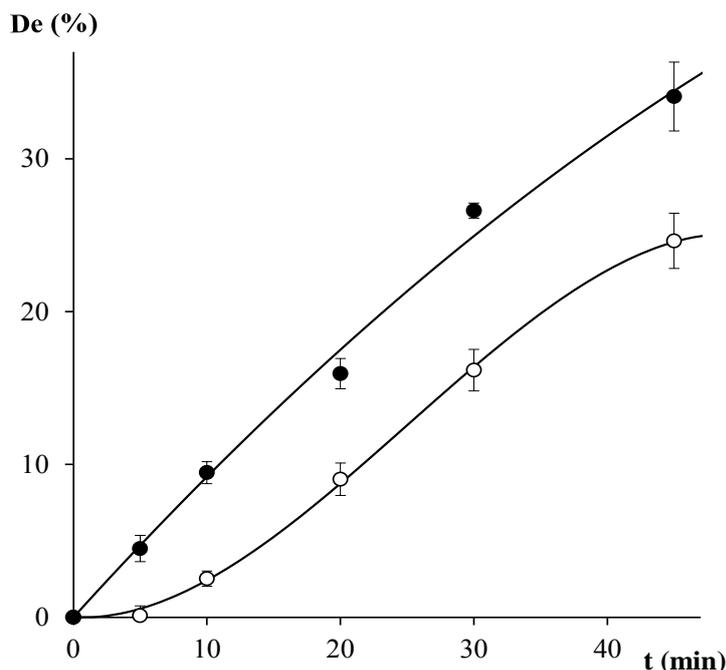


Figura 4.13. Influencia del caudal y tiempo sobre la detergencia de almidón con soluciones pH 13, CMP = 0.1 g/L. a) 30 L/h (○), b) 60 L/h (●)

Finalmente, la concentración de partículas S50 en suspensión (CMP) es un factor que ha mostrado distinto efecto en función de la solución de lavado utilizada. Cuando se ha utilizado solución a pH 7, 10 o 13 (Diseño 1, apartado 4.1.2.1) este factor no resultó estadísticamente significativo. Sin embargo, en soluciones a pH constante con 1 g/L de AE (Diseño 2, 4.1.2.2) la CMP ejerce un efecto negativo sobre la detergencia. Por último, en soluciones con 1 g/L de APG (Diseño 3, 4.1.2.3) la CMP genera un efecto positivo sobre la detergencia condicionado al incremento del caudal. En la Figura 4.14 se muestran los perfiles detergencia/tiempo de los ensayos de lavado realizados a caudal y pH constante (30 L/h y pH 13) para distintas concentraciones de S50: 0 g/L (a), 0.1 g/L (b) y 1.0 g/L (c). En cada gráfica se comparan los resultados alcanzados con las tres soluciones de lavado utilizadas: solución sin tensioactivo, con 1 g/L AE y con 1 g/L APG. Las barras de error representan el intervalo \pm SD para al menos tres repeticiones de cada experimento.

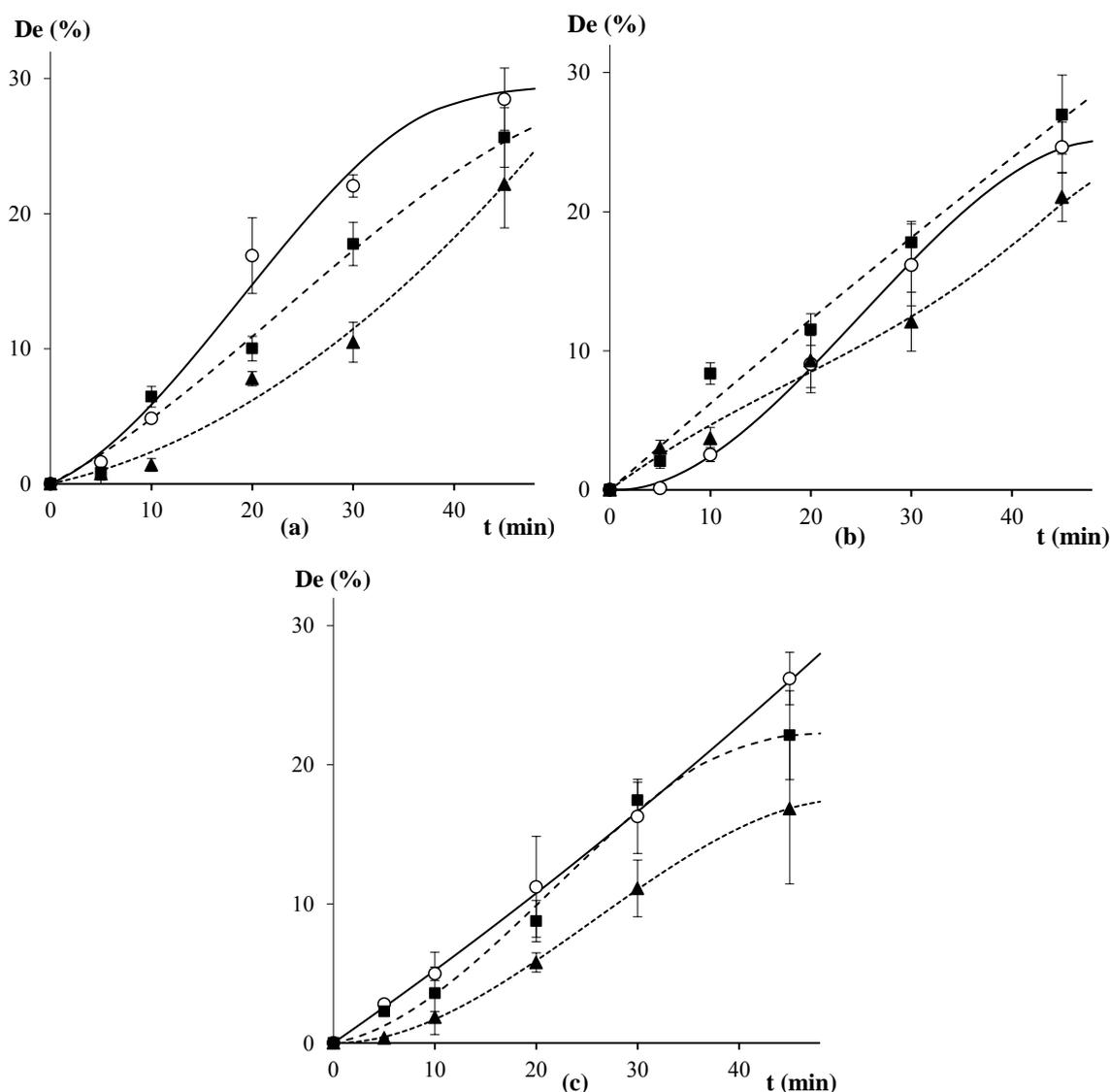


Figura 4.14. Influencia de la concentración de partículas S50 y tiempo sobre la detergencia de almidón. pH 13, Q = 30 L/h. Sin tensioactivo (○), 1.0 g/L AE (▲), 1 g/L APG (■). a) CMP=0 g/L, b) CMP=0.1 g/L, c) CMP=1.0 g/L

Al menor valor de caudal estudiado (30 L/h) no se observan variaciones significativas de detergencia cuando aumenta el valor de CMP en las soluciones sin tensioactivo y con APG, más allá de las debidas al error experimental. Sin embargo, sí se percibe un descenso de la detergencia al aumentar la CMP en las soluciones con AE. Si bien los valores de detergencia de esta solución en ausencia de S50 (CMP = 0 g/L) son menores a los de las demás, esta diferencia se acentúa cuando la CMP alcanza su mayor valor, 1.0 g/L.

La influencia de la concentración de partículas S50 sobre la detergencia es mayor al utilizar un caudal de 60 L/h. En la Figura 4.15 se representan los perfiles detergencia/tiempo en función de la CMP para las soluciones sin tensioactivo, con 1.0 g/L AE y con 1.0 g/L de APG cuando el caudal de circulación es 60 L/h.

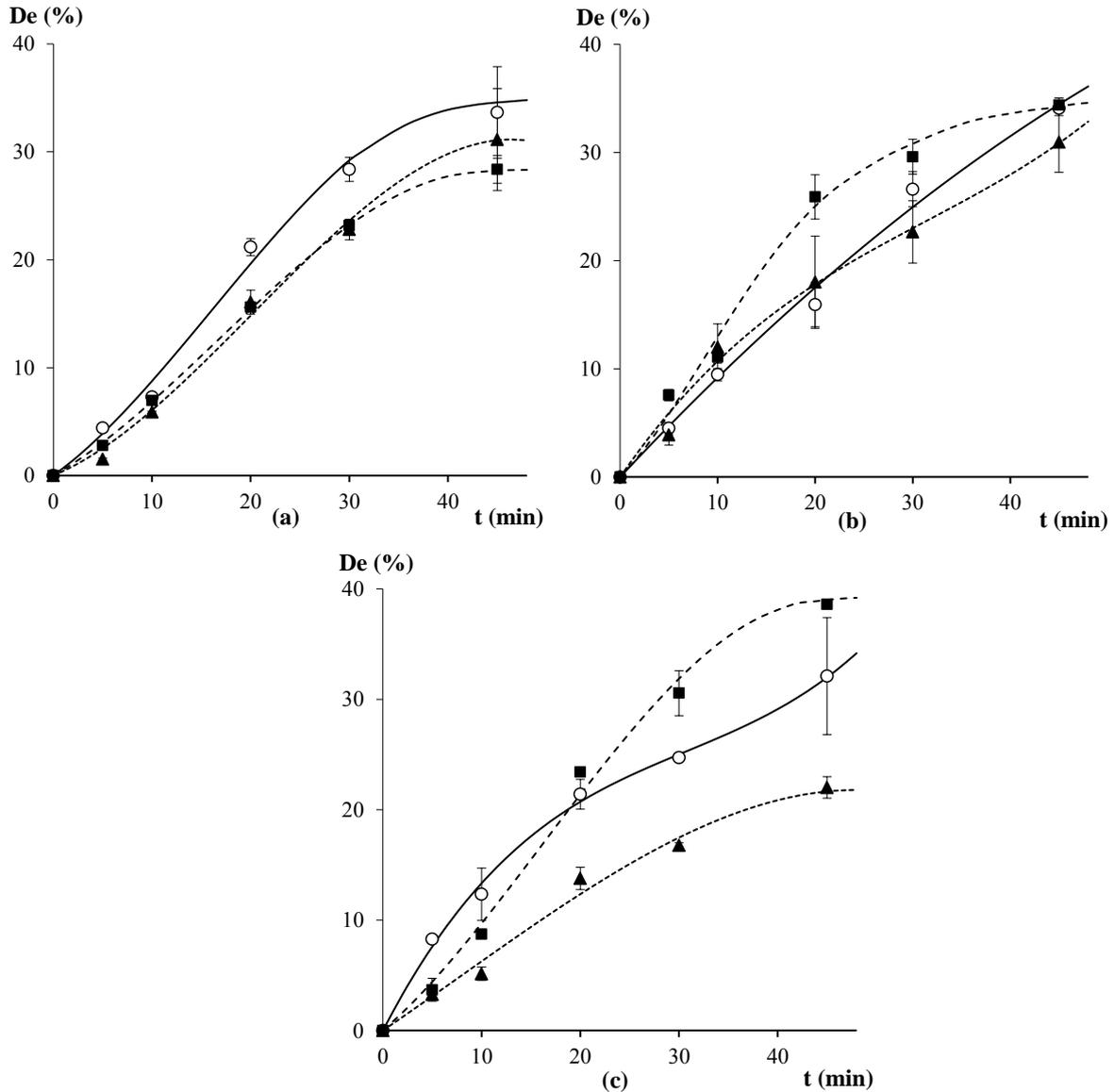


Figura 4.15. Influencia de la concentración de partículas S50 y tiempo sobre la detergencia de almidón. pH 13, Q = 60 L/h. Sin tensioactivo (○), 1.0 g/L AE (▲), 1 g/L APG (■). a) CMP=0 g/L, b) CMP=0.1 g/L, c) CMP=1.0 g/L

En estas gráficas se puede observar cómo mientras la detergencia de las soluciones sin tensioactivo no se ve afectada significativamente por la presencia de partículas S50 en suspensión, la detergencia de las soluciones que contienen 1.0 g/L de AE desciende de un 30% a un 20% aproximadamente. En las soluciones con 1.0

g/L de APG la detergencia aumenta hasta alcanzar casi un 40% en una concentración de S50 de 1.0 g/L. Los resultados obtenidos en los ensayos con CMP= 0.1 g/L tanto a 30 L/h como a 60 L/h no permiten observar con claridad los posibles efectos positivos o negativos que la presencia de las partículas S50 pueden tener sobre la detergencia. Por tanto, en soluciones de lavado con APG sería necesario añadir las micropartículas en una concentración cercana a 1.0 g/L para mejorar la eficacia de lavado.

4.2 Comportamiento de formulaciones detergentes que contienen α -amilasa en el proceso de lavado de almidón seco

4.2.1 Efecto de la presencia de tensioactivos sobre la actividad enzimática

En la Tabla 3.20 se muestra la actividad de la enzima α -amilasa en presencia de tensioactivos, medida en las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.2.1. En la Tabla 4.13 se muestran la actividad relativa media (AR_m) (valor medio de las réplicas individuales) y la desviación standard para cada uno de los tensioactivos ensayados. En la Figura 4.16 se muestran gráficamente estos valores.

Tabla 4.13. Actividad relativa de α -amilasa en ausencia y presencia de soluciones acuosas de tensioactivos (1.0 g/L)

Tensioactivo	AR_m (%)	SD (%)
Sin tensioactivo	100	11.46
AE	93.39	6.18
APG	96.30	12.28
PGE-OE2	99.99	6.21
PGE-OE17	104.00	12.95
ECA-OE3	90.54	6.92
ECA-OE10	101.41	4.98
LAS	94.24	11.32

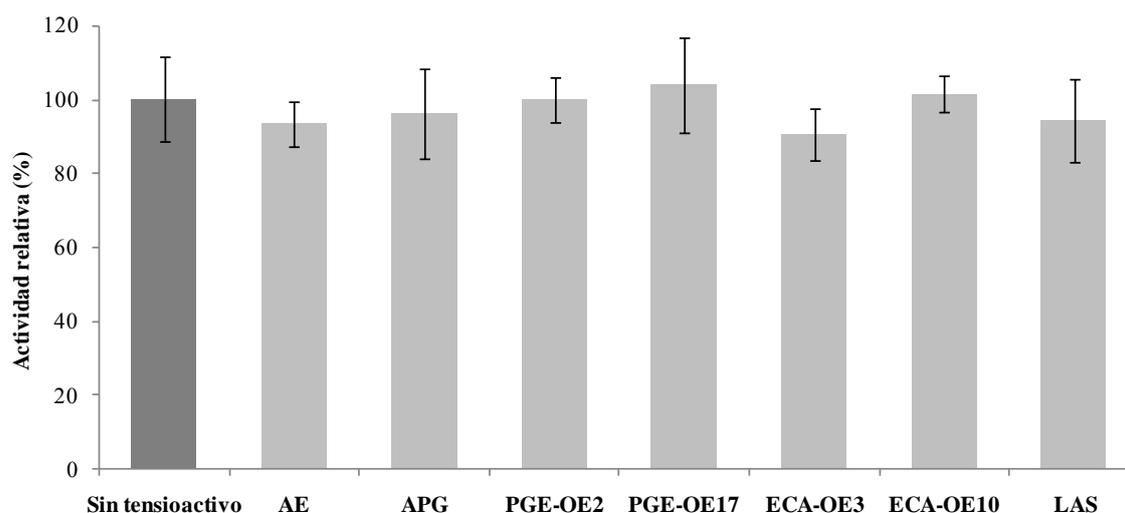


Figura 4.16. Actividad relativa de α -amilasa en presencia y ausencia de soluciones acuosas de tensioactivos (1.0 g/L)

Los resultados individuales de actividad se estudiaron mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los valores medios de actividad de cada solución estudiada.

La Tabla 4.14 muestra los resultados estadísticos obtenidos según el análisis ANOVA. Para el análisis estadístico de estos resultados se utilizó el software Statgraphics®Centurion XVI Versión 16.1.18.

Tabla 4.14. Análisis de la varianza de la actividad de α -amilasa en presencia de tensioactivos

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
Entre grupos	736.95	7	105.28	1.16	0.354
Intra grupos	2910.68	32	90.96		
Total	3647.63	39			

El p-valor resultante es muy superior a 0.05, por lo tanto el análisis ANOVA indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por tanto, podemos considerar que la actividad de la α -amilasa no se ve afectada de forma significativa cuando se encuentra en presencia de los tensioactivos estudiados, sean aniónicos o no iónicos, en las condiciones de ensayo utilizadas.

Este resultado es especialmente interesante en relación a los tensioactivos aniónicos estudiados. Numerosos estudios han indicado la inestabilidad y pérdida de actividad catalítica de las enzimas (incluyendo α -amilasas) en soluciones de tensioactivos aniónicos como el dodecilsulfato sódico (SDS), debida a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los monómeros o micelas de tensioactivo y las proteínas (Montserret *et al.*, 2000; Hagihara *et al.*, 2002; Tanaka y Hoshino, 2002). En concreto, se ha encontrado que el tensioactivo LAS desestabiliza a las proteasas (Russell y Britton, 2002) y reduce la actividad de la α -amilasa debido a la alteración de la estructura secundaria y terciaria de la proteína en ensayos realizados a 37 °C durante 15 minutos (Bravo *et al.*, 2006).

La estabilidad de la α -amilasa estudiada en presencia de LAS resulta, a la luz de estos resultados, especialmente interesante. Sin embargo, existen ejemplos en la bibliografía que también reflejan este comportamiento inusual. Tanaka y Hoshino (2002) y Jaiswal y Prakash (2011) describieron el aumento de la actividad de la α -amilasa en soluciones de SDS a concentraciones por debajo de su CMC, atribuyéndolo a la formación preferencial del complejo enzima-sustrato en dichas condiciones. También Antony *et al.* (2013) han descrito el aumento de la actividad catalítica de una α -amilasa en la pseudo fase micelar de soluciones de SDS, incrementándose su actividad al aumentar la concentración de tensioactivo por encima de su concentración micelar crítica. Este efecto, sin embargo, está condicionado a la temperatura y resulta significativo a temperaturas por debajo de 45 °C. El aumento de temperatura desestabiliza la débil interacción enzima-tensioactivo y por lo tanto el efecto de la presencia de SDS se reduce, alcanzándose valores de actividad enzimática similares a los obtenidos en ausencia de tensioactivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un descenso de la actividad de la α -amilasa en presencia de LAS, pero tan leve que no es significativo estadísticamente. Se puede concluir que la α -amilasa utilizada es estable en soluciones de LAS, no observándose efectos sinérgicos entre enzima y tensioactivo, probablemente porque las condiciones experimentales utilizadas (60 °C) no favorecen este efecto. Los otros tensioactivos aniónicos estudiados, los derivados de ácidos éter-carboxílicos (ECA), muestran un comportamiento similar al del LAS, reduciendo ligeramente la actividad de la α -amilasa (ECA-OE3) o no

causando efecto alguno (ECA-OE10). Aunque no se ha encontrado en la literatura información sobre la actividad enzimática en disolución de dichos tensioactivos, el resultado es coherente con el obtenido por el LAS. Se puede concluir por tanto que la α -amilasa estudiada es estable en soluciones de tensioactivos aniónicos en condiciones de temperatura y concentración habituales en los procesos de lavado de superficies duras.

Por otro lado, los tensioactivos no iónicos no alteran la conformación de las proteínas puesto que no provocan efectos electrostáticos (Hagihara *et al.*, 2002; Russell y Britton, 2002). Este hecho sugiere que las enzimas no deberían verse afectadas por estos tensioactivos. Esto se confirma en los resultados de actividad enzimática obtenidos en este trabajo en presencia de los cuatro tensioactivos no iónicos ensayados, AE, APG, PGE-OE2 y PGE-OE17. Martínez-Gallegos *et al.* (2011) obtuvieron similares resultados para la misma enzima en soluciones de distintos AE, mientras que Hoshino y Tanaka (2003) obtuvieron un aumento de la velocidad de hidrólisis de amilopectina de hasta un 65% en soluciones enzimáticas con concentraciones del tensioactivo Brij 35 (alcohol etoxilado) superiores a su CMC.

Bravo *et al.* (2008) observaron un ligero incremento en la actividad de la α -amilasa en soluciones acuosas de APG si bien este efecto no ha sido observado en este trabajo. La capacidad de los APG para estabilizar enzimas en formulaciones detergentes líquidas (von Rybinski y Hill, 1998) indica que los APG no alteran los mecanismos de hidrólisis y son tensioactivos aptos para la formulación de detergentes enzimáticos. No se han encontrado referencias en relación a la actividad enzimática en soluciones de ésteres de glicerina polietoxilados (PGEs) debido a su reciente introducción en el mercado, pero los resultados obtenidos confirman que son tensioactivos compatibles con la formulación de detergentes de base enzimática.

4.2.2 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante de soluciones de lavado que contienen α -amilasa.

En este apartado se estudia la detergencia alcanzada con soluciones enzimáticas en ausencia de tensioactivos, analizándose la influencia que ejerce sobre el lavado la concentración de enzima (CE), temperatura (T) y concentración de micropartículas Sipernat 50 (CMP). El resto de condiciones experimentales se mantuvieron constantes en los parámetros definidos en la Tabla 3.24 (ver apartado 3.2.2).

En la Figura 4.17 se puede observar la influencia que ejerce la concentración de enzima y la temperatura sobre la detergencia en función del tiempo. Las barras de error representan el intervalo \pm SD.

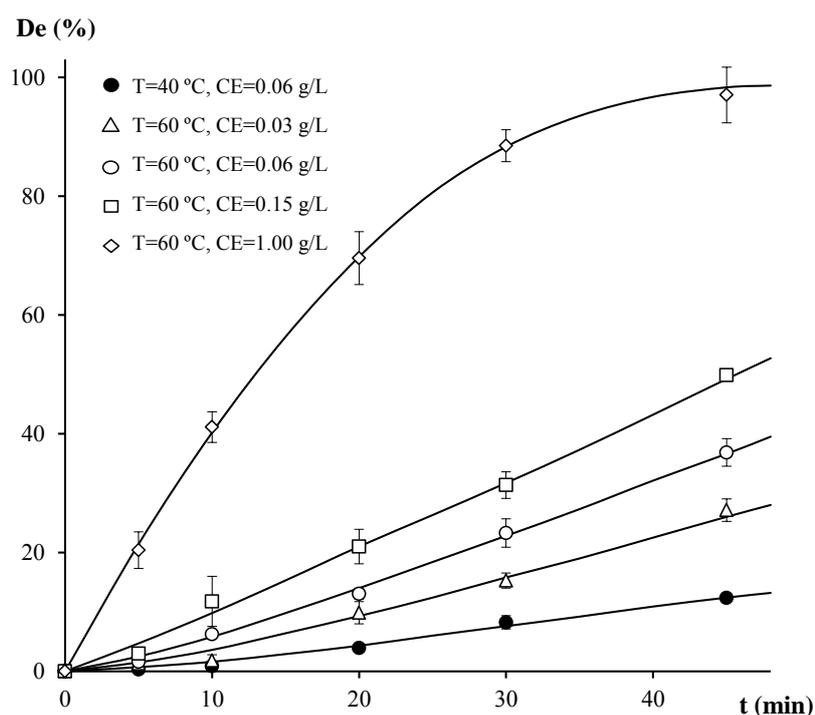


Figura 4.17. Influencia de la concentración de enzima y temperatura sobre la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable, pH=7

Se observa que la detergencia aumenta con la concentración de enzima utilizada. A 60°C y 1.0 g/L se alcanza una detergencia del 97% al cabo de 45 minutos.

El uso de α -amilasa en soluciones detergentes para el lavado de almidón seco es por tanto altamente efectivo. La concentración óptima de enzima que contendrá un detergente comercial vendrá determinada por un balance económico que considere el coste de la enzima y la eficacia de lavado que se pretende conseguir. En la actualidad los detergentes enzimáticos contienen entre 0.5-2% en peso de enzima (Becker y Haake, 2010; Pitombeira y Cohrs, 2014), aunque la cantidad de proteína real que contiene depende de la pureza de la materia prima utilizada. Asimismo, la concentración de proteína en el baño de limpieza dependerá también del volumen de la disolución utilizada en el lavado, aunque suele limitarse a unos pocos miligramos por litro (Gormsen *et al.*, 1998). Las concentraciones de enzima utilizadas en este estudio pueden considerarse consistentes con este dato teniendo en cuenta que, según la información proporcionada por el fabricante, una concentración de 0.06 g/L de la α -amilasa estudiada equivale a 1.6 mg de proteína/L.

El efecto que ejerce la temperatura sobre la detergencia cuando se utilizan soluciones de α -amilasa se ha estudiado por tanto a esta concentración de referencia de 0.06 g/L, realizándose ensayos de lavado a 40 y 60 °C. En la Figura 4.17 se puede observar que este incremento de temperatura casi triplica el resultado de detergencia a tiempo final (aumenta un 198% para la misma concentración de enzima). Utilizando gel de almidón húmedo como suciedad, Jurado *et al.* (2011c) ya obtuvieron un aumento significativo de la detergencia con soluciones de α -amilasa al aumentar la temperatura. Este efecto se ve ahora corroborado cuando se utiliza almidón seco, cuyo proceso de lavado es sin duda más complejo debido a la fuerte adhesión al sustrato y a su dificultad para el mojado y solubilización. El aumento de temperatura es clave para el lavado de almidón depositado sobre sustratos porosos (como el utilizado en este estudio), mientras que su efecto positivo sobre la detergencia se reduce cuando el sustrato presenta una superficie lisa (Jurado *et al.*, 2011c).

Es bien conocido que la temperatura tiene una influencia importante en los procesos de detergencia, favoreciendo el arrastre y disolución de la suciedad. Concretamente, para depósitos sólidos la temperatura es el principal factor que contribuye a la limpieza y el que determina el tiempo de lavado, tanto a altas como a bajas velocidades de flujo, así como con altas y bajas concentraciones de detergentes (Goode *et al.*, 2013). A temperaturas elevadas se rompen los enlaces de hidrógeno

intermoleculares del almidón permitiendo la penetración del agua en su estructura y disminuyendo su viscosidad, lo que sin duda favorece la detergencia (Bertuzzi *et al.*, 2007). Además, las altas temperaturas inducen el hinchamiento del almidón seco facilitando la acción hidrolítica de la α -amilasa y la disolución del almidón en el baño de lavado (Olsen y Falholt, 1998). Finalmente, se debe tener en cuenta que la actividad enzimática aumenta con la temperatura siempre y cuando se utilice una enzima termoestable como la utilizada en este estudio.

En la Figura 4.18 se muestra la eficacia de lavado alcanzada con soluciones de NaOH de pH=13 (medio habitualmente utilizado en procesos de limpieza CIP) y con soluciones enzimáticas (CE=0.06 g/L, pH=7). Los ensayos tuvieron lugar bajo las mismas condiciones experimentales de tiempo total del ensayo (45 min) y caudal(30 L/h). En ambos casos la detergencia alcanzada en el BSF a tiempo final (De_f) aumenta con la temperatura. En estas condiciones experimentales se observa que, si bien a 40 °C la opción de la limpieza alcalina tiene resultados mucho mejores que el uso de enzima a esta concentración, la diferencia entre ambas soluciones de limpieza se reduce mucho a 60 °C. El uso de enzima en estas condiciones podría resultar ventajoso debido a la menor contaminación ambiental que generan los efluentes del proceso de limpieza (Olsen y Falholt, 1998) y a la protección que tienen las superficies que se lavan al trabajar a pH neutro.

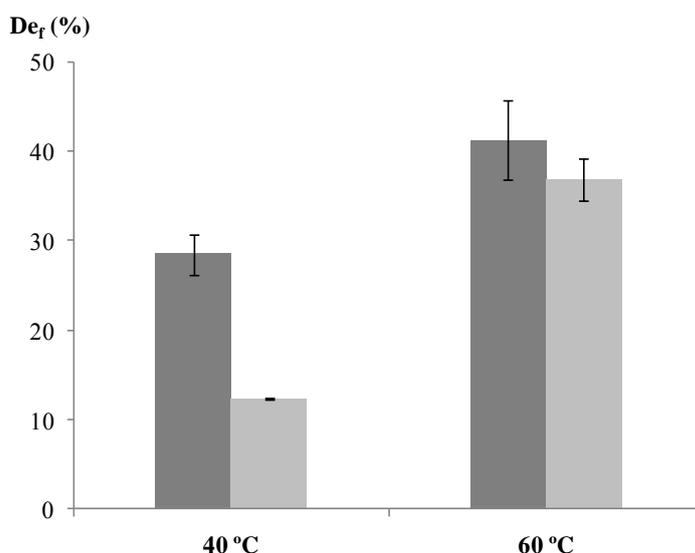


Figura 4.18. Comparación de la detergencia obtenida en BSF a distintas temperaturas con soluciones alcalinas (pH=13) (■) y soluciones enzimáticas (pH=7, CE= 0.06 g/L) (□). t = 45 min

Finalmente se realizó un ensayo de lavado a 60 °C en el que la α -amilasa (CE=0.06 g/L) se añadió sobre una suspensión de micropartículas Sipernat 50 (CMP = 1.0 g/L). En la Figura 4.19 se muestra el perfil detergencia/tiempo obtenido en comparación con la detergencia de la solución enzimática a 0.06 g/L. Las barras de error muestran la desviación standard de las tres réplicas realizadas. Se observa que no hay diferencias significativas en la detergencia de la solución enzimática con y sin partículas.

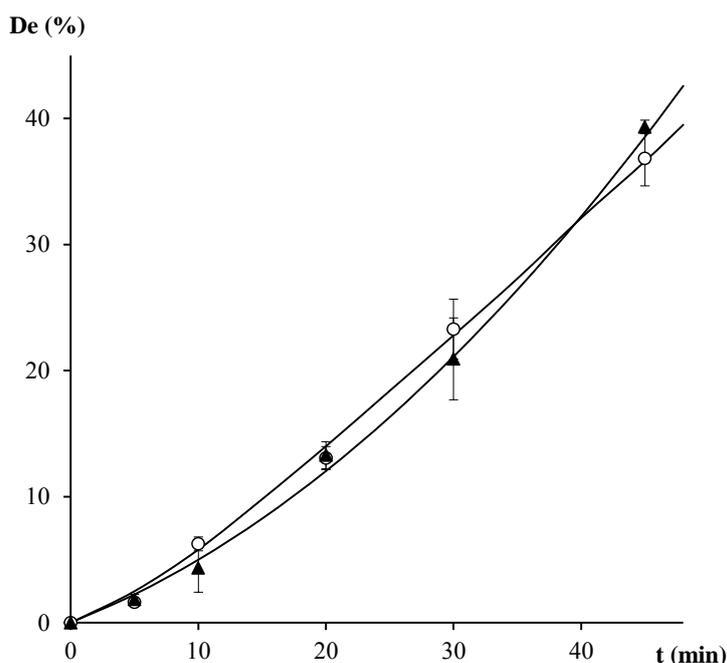


Figura 4.19. Comparación de la detergencia obtenida en BSF con soluciones enzimáticas en presencia y ausencia de partículas S50, pH=7, CE= 0.06 g/L (○ CMP=0 g/L, ▲ CMP=1.0 g/L)

Soleimani *et al.* (2012, 2013) obtuvieron un aumento en la eficacia de lavado de suciedades amiláceas y proteicas inmovilizando las enzimas por adsorción física en nanopartículas de sílice e incorporando la enzima inmovilizada a soluciones detergentes estandarizadas. Por otra parte, Lee *et al.* (2009a) estudió el efecto de la adición tanto simultánea como secuenciada de nanopartículas (de sílice y laponita) y α -amilasa sobre depósitos de almidón y concluyeron que la adición simultánea de nanopartículas de sílice y α -amilasa incrementaba ligeramente la actividad enzimática sobre el sustrato. Sin embargo, en el experimento realizado en este trabajo los posibles efectos positivos de la adición de micropartículas de sílice sobre la detergencia de soluciones enzimáticas no se muestran con claridad.

4.2.3 Evaluación de la detergencia de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante soluciones de lavado que contienen α -amilasa y tensioactivos

Una vez estudiada la actividad de la α -amilasa en presencia de tensioactivos aniónicos y no iónicos se ha estudiado la detergencia que producen dichas soluciones en un dispositivo BSF en las condiciones descritas en el apartado 3.2.3, 0.06 g/L de enzima, 1.0 g/L de tensioactivo, solución tampón pH 7 y temperatura (40-60°C). Los ensayos de lavado se llevan a cabo en condiciones experimentales similares a los ensayos de actividad de la α -amilasa, lo que permite analizar la influencia que pueden tener estas variables sobre la detergencia.

En la Figura 4.20 se muestran los perfiles detergencia/tiempo alcanzados en los ensayos de lavado realizados con tensioactivos no iónicos a 40°C y 60 °C. En la Figura 4.21 se representan los perfiles detergencia/tiempo de los ensayos con tensioactivos aniónicos a 60 °C.

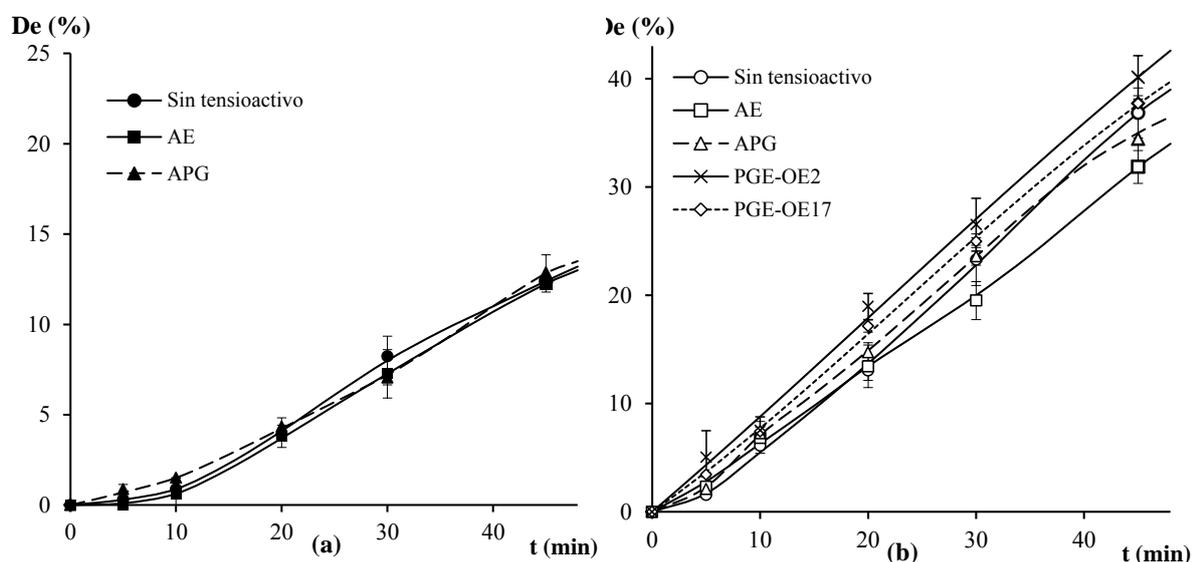


Figura 4.20. Comparación de la detergencia obtenida en BSF con soluciones enzimáticas en presencia de tensioactivos no iónicos (1.0 g/L), CE=0.06 g/L en solución tampón pH 7: (a) 40 °C, (b) 60 °C

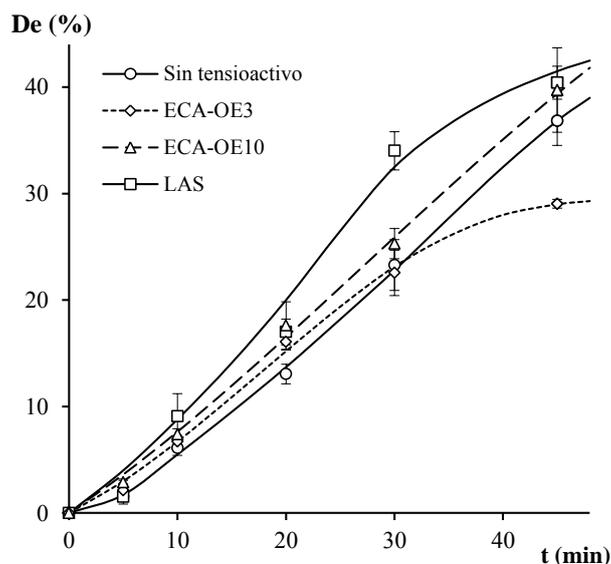


Figura 4.21. Comparación de la detergencia obtenida en BSF con soluciones enzimáticas en presencia de tensioactivos aniónicos (1.0 g/L), CE=0.06 g/L en solución tampón pH 7. 60 °C

Un primer análisis de los perfiles detergencia-tiempo obtenidos con soluciones de enzima en ausencia de tensioactivo en comparación con los obtenidos con soluciones que incorporan distintos tensioactivos conduce a afirmar que el efecto de los tensioactivos sobre la detergencia es débil, especialmente a baja temperatura. Un efecto similar se ha encontrado en soluciones de lavado alcalinas (pH 13) en el apartado 4.1.2 con los tensioactivos AE y APG. A 40 °C los perfiles detergencia-tiempo prácticamente coinciden, independientemente de si la solución enzimática contiene o no tensioactivos (no iónicos en este caso), lo que indica que hay un efecto prácticamente nulo a dicha temperatura (con una detergencia máxima del 13%). Este resultado concuerda con el obtenido por Jurado *et al.* (2015) en ensayos de lavado de almidón seco sobre sustrato poroso (en este caso, se utilizaba como sustrato discos de poliuretano). Sin embargo, cuando la suciedad es gel de almidón húmedo la adición de tensioactivos sí que tiene un efecto positivo sobre la detergencia (Jurado *et al.*, 2011c), debido a que éstos modifican las propiedades reológicas del gel de almidón. En concreto, los tensioactivos iónicos disminuyen la viscosidad de los geles de almidón aumentando su hinchamiento, y por tanto, la deformación de sus gránulos (Radhika y Moorthy, 2008).

A 60 °C sí se pueden percibir ciertas diferencias entre las distintas soluciones estudiadas, sobre todo a partir de los 20 minutos de lavado. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados de detergencia obtenidos a tiempo final De_f

(45 min) con cada una de las soluciones de lavado estudiadas (solución 0.06 g/L α -amilasa en tampón pH 7 en ausencia y presencia de 1.0 g/L de cada uno de tensioactivos) para evaluar si estas diferencias eran significativas. Su resultado se muestra en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Análisis de la varianza de la detergencia De_f obtenida con soluciones enzimáticas en ausencia y presencia de tensioactivos

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
Entre grupos	308.55	7	44.08	7.91	0.0008
Intra grupos	72.42	13	5.57		
Total	380.98	20			

Puesto que el p-valor de la prueba es mucho menor que 0.05 existe una diferencia estadísticamente significativa entre las detergencias medias a tiempo final en las 8 disoluciones estudiadas con un nivel del 95.0% de confianza.

Para discriminar cuáles de los tensioactivos utilizados proporcionan una detergencia significativamente diferente a los demás se ha aplicado el procedimiento de mínima diferencia significativa de Fisher (Least Significant Difference o LSD) a las detergencias obtenidas con soluciones enzimáticas en ausencia y presencia de tensioactivos. Mediante este procedimiento se obtienen las diferencias mínimas y las reales entre cada par de conjuntos de datos (resultados que se muestran en la Tabla 3.16). Mediante asterisco se indican los pares de conjuntos cuyas medias muestrales son significativamente diferentes con un nivel del 95% de confianza.

Tabla 4.16. Diferencias mínimas y diferencias estimadas entre cada par de medias de detergencia de soluciones enzimáticas (CE=0.06 g/L)

Contraste	Dif. mínima	Dif. estimada	Significación
Sin tensioactivo – AE	4.6549	4.9856	*
Sin tensioactivo – APG	4.6549	2.3920	
Sin tensioactivo–ECA-OE3	5.0992	7.7865	*
Sin tensioactivo – ECA-OE10	4.6549	-2.8935	
Sin tensioactivo – PGE-OE2	4.6549	-3.2866	
Sin tensioactivo – PGE-OE17	5.0992	-0.8657	
Sin tensioactivo – LAS	4.6549	-3.5893	
AE – APG	4.1635	-3.5937	
AE - ECA-OE3	4.6549	2.8008	
AE – ECA-OE10	4.1635	-7.8793	*
AE – PGE-OE2	4.1635	-8.2723	*
AE – PGE-OE17	4.6549	-5.8514	*
AE – LAS	4.1635	-8.5751	*
APG – ECA-OE3	4.6549	5.3945	*
APG – ECA-OE10	4.1635	-5.2855	*
APG – PGE-OE2	4.1635	-5.6786	*
APG – PGE-OE17	4.6549	-3.2577	
APG – LAS	4.1635	-5.9813	*
ECA-OE3 – ECA-OE10	4.6549	-10.6800	*
ECA-OE3 – PGE-OE2	4.6549	-11.0731	*
ECA-OE3 – PGE-OE17	5.0992	-8.6522	*
ECA-OE3 – LAS	4.6549	-11.3758	*
ECA-OE10 – PGE-OE2	4.1635	-0.3930	
ECA-OE10 – PGE-OE17	4.6549	2.0278	
ECA-OE10 – LAS	4.1635	-0.6958	
PGE-OE2 – PGE-OE17	4.6549	2.4209	
PGE-OE2 – LAS	4.1635	-0.3028	
PGE-OE17 – LAS	4.6549	-2.7236	

A partir de estas diferencias la prueba de Fisher detecta cuatro grupos homogéneos de soluciones enzimáticas (nombrados *a*, *b*, *c* y *d* en orden de menor a mayor detergencia media). En la Figura 4.22 se representa la detergencia media a tiempo final (De_f) y desviación standard (mediante barra de error) de cada una de las formulaciones de lavado estudiadas, indicando los grupos homogéneos en los que se incluye cada una.

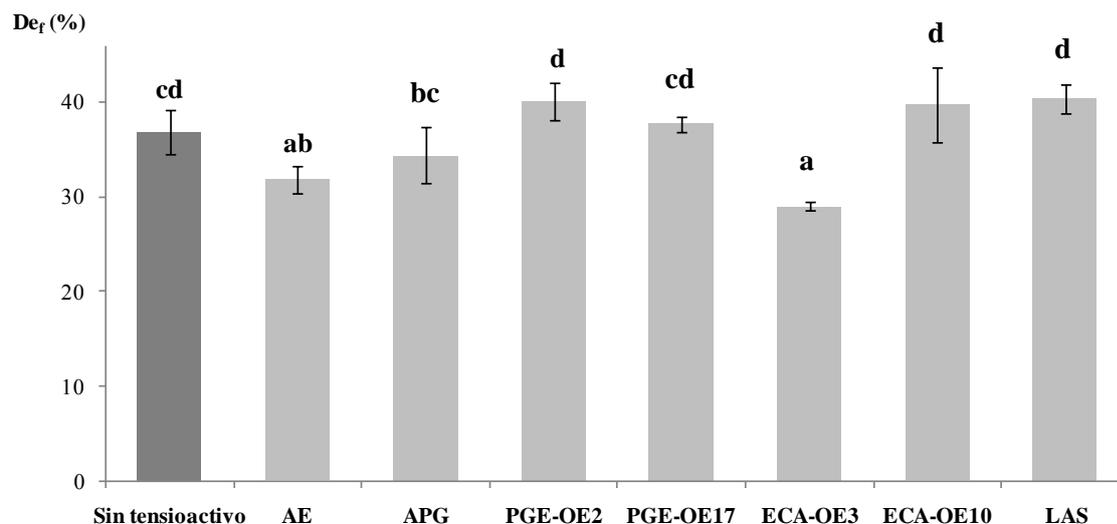


Figura 4.22. Detergencia obtenida a tiempo final (45 min) en soluciones enzimáticas (CE=0.06 g/L en solución tampón pH 7). Influencia de la presencia de tensioactivos (1.0 g/L).(La barra de error representa la desviación standard. Las letras *a-d* denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Fisher al 95% de nivel de confianza)

Teniendo en cuenta que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas disoluciones que comparten un grupo, se puede afirmar que sólo las disoluciones enzimáticas que contienen los tensioactivos AE y ECA-OE3 tienen una detergencia media significativamente diferente a la obtenida por la solución enzimática sin tensioactivos en las condiciones del ensayo (60 °C, 30 L/h, 45 minutos). La eficacia de lavado de ambas soluciones es inferior a la detergencia media obtenida por las demás soluciones detergentes. Por lo tanto, se puede afirmar que la adición de estos tensioactivos indicados no mejora la detergencia de la solución enzimática.

El análisis de la varianza a los resultados de actividad relativa (A_R) realizado en 4.2.1 no detectó variaciones significativas de la actividad de la α -amilasa en presencia de los tensioactivos estudiados, por lo que el descenso en la detergencia de las soluciones con AE y ECA-OE3 no es debido en principio a una inhibición de la capacidad hidrolítica de la enzima, si bien ambos tensioactivos son los que produjeron una reducción mayor (aunque no estadísticamente significativa) en la actividad.

No se dispone de información bibliográfica acerca de la actividad enzimática o comportamiento (por ejemplo, formación de complejos) que presentan las disoluciones de ácidos alquil éter carboxílicos (ECA) en disoluciones de almidón. El descenso en la detergencia observado cuando a la solución enzimática se le añade el tensioactivo ECA-OE₃ puede estar relacionado con su bajo grado de etoxilación, sobre todo en comparación con el tensioactivo homólogo estudiado, el ECA-OE₁₀, que presenta una detergencia similar a la obtenida en ausencia de tensioactivos. El ECA-OE₃ tiene un carácter más hidrofóbico lo que podría afectar al proceso de lavado.

Con respecto al AE, el ligero descenso en la actividad de la α -amilasa encontrado se puede relacionar con los resultados obtenidos por Bravo *et al.* (2006) bajo distintas condiciones experimentales. Por otra parte, en la Figura 4.20 (b) se observa que el descenso de la detergencia con AE respecto de los valores obtenidos por la solución enzimática sin tensioactivos tiene lugar a partir de los 20 minutos. Teniendo en cuenta que Martínez-Gallegos *et al.* (2011) indicaron que los AE tienen una cierta tendencia a la formación de complejos de inclusión con el almidón, el descenso de detergencia podría indicar una cierta competición entre el tensioactivo y la α -amilasa por el sustrato, afectando los fenómenos de complejación a la actividad catalítica.

Puesto que este efecto parece ser dependiente del tiempo y se observó a partir de los 20 minutos de ensayo, se planificó un experimento de lavado con solución de α -amilasa (CE=0.06 g/L) y adición progresiva de AE a 60 °C, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.17 y la Figura 4.23. En los primeros 20 minutos la solución detergente sólo contenía enzima; a los 20 minutos se añadió AE hasta alcanzar una concentración de 1.0 g/L en el baño de lavado y a los 40 minutos se añadió AE de nuevo para llegar a una concentración de 2.0 g/L, prolongando la duración del ensayo hasta los 60 minutos. Para ello se añadieron 5 mL de una disolución concentrada de AE de 100 g/L a los 20 y a los 40 minutos. Teniendo en cuenta que el volumen total del baño de lavado es de 500 mL se puede considerar que el incremento de volumen por la adición de tensioactivo es despreciable. En la Tabla 4.17 se muestran los resultados de detergencia medios obtenidos en función del tiempo y la desviación standard de las tres réplicas realizadas. En la Figura 4.23 se muestra el perfil detergencia/tiempo del ensayo de adición progresiva de AE

comparándose con los resultados obtenidos con los ensayos de lavado de la misma solución enzimática sin tensioactivo y con AE 1.0 g/L.

Tabla 4.17. Influencia de la adición progresiva de AE sobre la detergencia de una solución enzimática (CE=0.06 g/L en tampón pH 7), 60 °C

t, min	C _{AE} (g/L)	De (%)	SD (%)
0	0.0	0.00	0.00
5	0.0	2.46	1.47
10	0.0	6.13	1.09
20	1.0	14.20	0.89
30	1.0	19.88	2.46
40	2.0	27.60	0.99
50	2.0	32.17	1.20
60	2.0	38.53	0.62

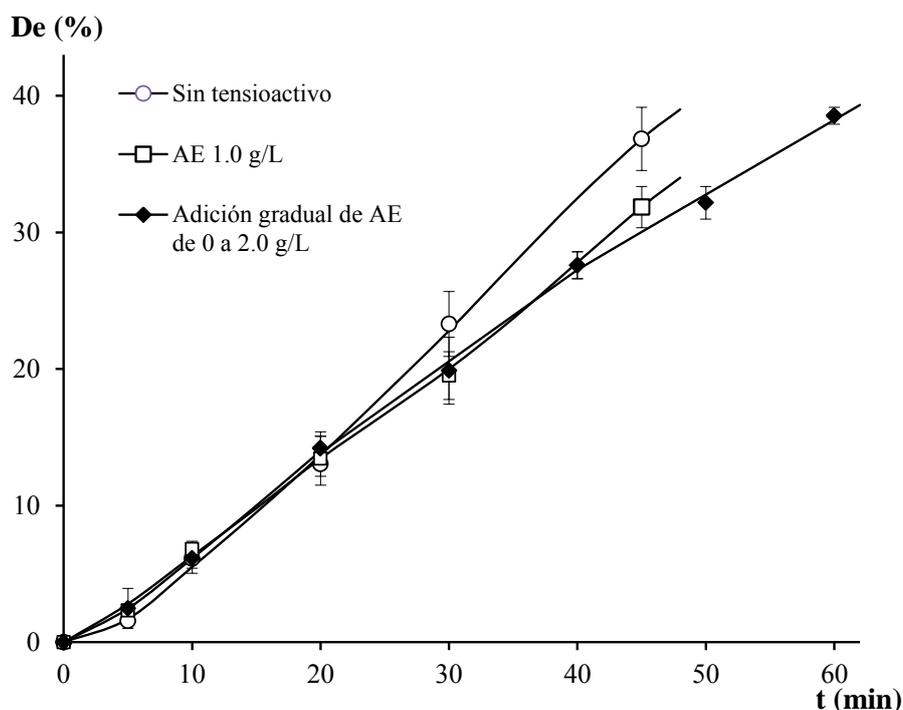


Figura 4.23. Comparación de la detergencia obtenida en BSF con soluciones enzimáticas (CE=0.06 g/L en solución tampón pH 7) sin tensioactivo, con 1 g/L de AE y con adición progresiva de AE de 0 a 2 g/L, 60 °C (en adición progresiva de AE, C_{AE} =0.0 g/L de 0 a 20 min, C_{AE} = 1.0 g/L de 20 a 40 min y C_{AE}=2.0 g/L de 40 a 60 min)

Se puede observar que en el ensayo de adición secuencial de AE la pendiente del perfil detergencia-tiempo va disminuyendo conforme se adiciona el tensioactivo. Durante los primeros 20 minutos los perfiles de lavado son muy similares, contenga

o no AE la solución enzimática. A partir de los 20 minutos los tres perfiles de detergencia se van separando, siendo menor la detergencia del ensayo de adición secuencial de AE en el tramo en el que su concentración ya es de 2.0 g/L. A esta concentración la detergencia a 50 minutos es igual a la obtenida sólo en 45 minutos en el ensayo con C_{AE} constante a 1.0 g/L. Igualmente, cuando han transcurrido 60 minutos y $C_{AE} = 2.0$ g/L la detergencia es sólo ligeramente superior a la obtenida a 45 minutos con la solución enzimática en ausencia de tensioactivo. Estos resultados parecen confirmar el efecto negativo del tensioactivo AE sobre la detergencia de soluciones de α -amilasa, efecto más acusado conforme aumenta su concentración en la solución de lavado.

Las soluciones enzimáticas con los tensioactivos LAS, PGE-OE2 y ECA-OE10 son las que han demostrado valores superiores de detergencia a todos los tiempos estudiados, aún sin ser la diferencia a tiempo final estadísticamente significativa con respecto a la solución sin tensioactivos. Jurado *et al.* (2012a) encontraron que el éster de glicerina polietoxilado PGE-OE2 mostraba un alto poder de mojado, sobre todo en comparación con el PGE-OE17, lo que podría influir positivamente en la eficacia de lavado del almidón seco. El lavado con LAS de gel de almidón húmedo y de proteína sobre diversos tipos de sustrato ha sido estudiado por Jurado *et al.* (2011c, 2014), obteniendo en estos estudios un grado de detergencia similar al obtenido con diversos tensioactivos no iónicos en las mismas condiciones experimentales.

4.3 Limpieza de almidón seco mediante aplicación de corriente continua

En este apartado se analizan los resultados obtenidos en los ensayos de lavado de almidón seco adherido a esferas de acero inoxidable realizados en el dispositivo de electrolimpieza descrito en el apartado 2.9. El estudio de la eficacia de lavado se estructuró en dos fases. En la primera se estudiaron diversos factores que podían afectar a la limpieza y se definieron las condiciones de trabajo que maximizan la detergencia y minimizan el consumo energético a partir de los resultados mostrados en el apartado 3.3.1. A partir de los resultados experimentales mostrados en el

apartado 3.3.2 se estudia la contribución que sobre la eficacia de lavado tiene el uso de tensioactivos en el proceso de electrolimpieza.

4.3.1 Análisis de la influencia de distintas variables en el proceso de lavado mediante electrolimpieza

4.3.1.1 Influencia de voltaje y polaridad

Se estudió la limpieza mediante corriente continua utilizando una disolución acuosa de NaOH de pH 13 y conectando las esferas sucias al polo negativo del generador (cátodo) de manera que se utilizan las condiciones de la limpieza catódica (ver 1.5.1). De esta forma se pretenden combinar varios efectos que podrían contribuir a la limpieza del almidón. Por una parte, la degradación que experimentan los gránulos de almidón en soluciones altamente alcalinas (Han y Lim, 2004; Lai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009b) podría verse incrementado por el aumento del pH en las proximidades del cátodo debido a la liberación de iones hidroxilo como producto de la reacción de reducción. Por otra parte, la liberación de burbujas de gas hidrógeno en la misma reacción realiza una acción mecánica de arrastre que puede contribuir al desprendimiento del almidón seco adherido a las esferas (Zaki, 2007).

Con estas premisas se estudió la influencia del voltaje aplicado en la electrolimpieza de las esferas de acero inoxidable conectadas al cátodo realizando los ensayos de lavado a una temperatura de 20 °C. Los resultados se mostraron en la Tabla 3.33, representándose en la Figura 4.24 la detergencia media (De) obtenida en ensayos de lavado de duración 10 minutos (a) y 20 minutos (b) en función del voltaje aplicado en el intervalo de 0 V (sin conexión al generador) hasta 10 V. La barra de error representa la desviación standard de las tres réplicas realizadas de cada experimento.

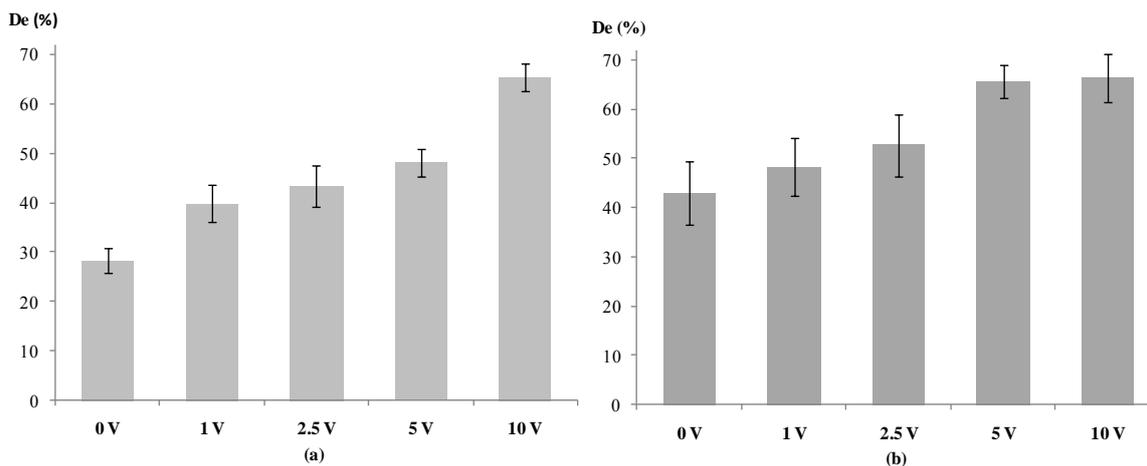


Figura 4.24. Influencia del voltaje aplicado sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua (20°C, pH 13). Tiempo de operación: a) 10 minutos, b) 20 minutos

Tanto en periodos de lavado de 10 como de 20 minutos se observa en primer lugar que la aplicación de corriente continua a las esferas ensuciadas supone un incremento significativo de la detergencia, siendo ésta mayor cuanto mayor es el voltaje aplicado. El incremento en la detergencia es especialmente importante en los ensayos de 10 minutos de duración. Para este tiempo de lavado y aplicando un voltaje de 5 V, la detergencia aumenta un 70% con respecto a la obtenida en ausencia de corriente, y este aumento llega a un 131% cuando se aplica un potencial de 10 V. En estos ensayos la mayor eficacia de lavado se alcanza con un voltaje de 10 V. Cuando la duración del ensayo es de 20 minutos la detergencia es muy similar cuando se aplican 5 V ó 10 V y a su vez prácticamente igual a la obtenida con 10 V durante 10 minutos. Desde un punto de vista de consumo eléctrico, seguridad y protección de las superficies metálicas a lavar será más conveniente trabajar con el mejor voltaje posible siempre y cuando garantice unos resultados de lavado adecuados. Considerando este criterio las condiciones óptimas de lavado se alcanzarían cuando se aplican 5 V de corriente continua durante 20 minutos.

El uso de una disolución alcalina de pH 13 como fórmula de lavado del almidón seco en el dispositivo BSFse ha estudiado en capítulos anteriores, donde a 40 °C y con un caudal de circulación de 30 L/h sólo se alcanzó una detergencia del 28,48% al cabo de 45 minutos (ver Tabla 3.14). Esta detergencia obtenida en el dispositivo BSF es similar a la alcanzada en el dispositivo de electrolimpieza a 20 °C aún sin aplicar corriente continua tras sólo 10 minutos, y sensiblemente menor a la

obtenida tras 20 minutos de lavado. Se considera que esto es debido al empaquetamiento de las esferas sucias en la columna de lavado del BSF y a la consiguiente dificultad de acceso de la solución pH 13 a la suciedad. Teniendo estos valores de detergencia como referencia, la eficacia de lavado de la solución pH 13 en BSF aumenta si se modifican factores influyentes en el lavado: al aumentar el caudal de 30 a 60 L/h la detergencia aumentaba un 18% (ver Tabla 3.15), mientras que si se eleva la temperatura de 40 a 60 °C aumentaba un 45% (Figura 4.18). Estos incrementos quedan muy lejos de los alcanzados en el dispositivo de electrolimpieza aplicando voltajes de tan sólo 5 V o 10 V, lo que indica que este método es altamente adecuado para la limpieza de almidón seco adherido a superficies de acero inoxidable en las que este dispositivo se pueda aplicar.

Posteriormente se analizó la influencia que tiene sobre el lavado un cambio en la polaridad del sistema. Para ello, utilizando las condiciones de lavado señaladas (solución acuosa de NaOH de pH 13, 20 °C, 5 V, 20 minutos), se conectaron las esferas ensuciadas al ánodo del generador de CC. En la Figura 4.25 se muestran los resultados obtenidos cuando se produce un cambio en la polaridad en el proceso de electrolimpieza en comparación con los obtenidos por la limpieza catódica en las mismas condiciones y con los resultados obtenidos sin aplicación de corriente. La detergencia media del lavado con conexión al ánodo fue similar a la obtenida sin aplicar corriente alguna. Esto indica que no se ejerce efecto alguno sobre el proceso de limpieza. Sin embargo, cuando las esferas se conectan al cátodo, la detergencia es de un 65.7%, un 52% superior a la limpieza alcanzada sin llevar a cabo el proceso de electrolimpieza. A raíz de estos resultados se prosiguió con el estudio del lavado del almidón seco con conexión de las esferas al cátodo del generador de CC.

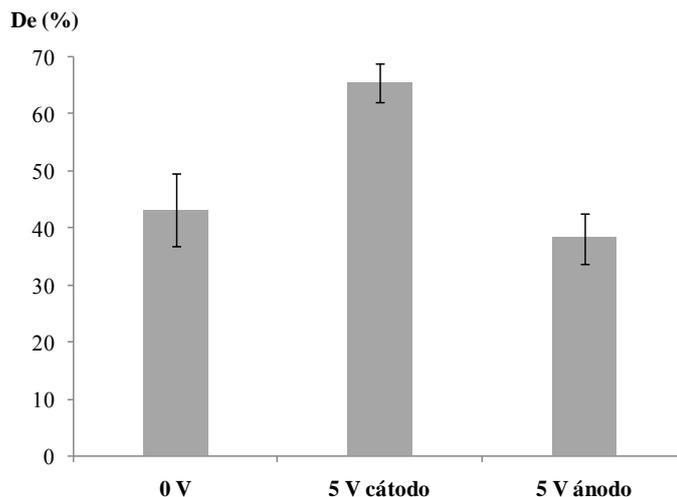


Figura 4.25. Influencia del cambio de polaridad sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. 20°C, pH 13, 20 minutos

4.3.1.2 Influencia de la temperatura

La temperatura es un factor fundamental a la hora de planificar los procesos de limpieza, especialmente cuando se trata de superficies sólidas (Goode *et al.*, 2013). Generalmente, un aumento de la temperatura facilita la limpieza pero también eleva los costes energéticos del proceso. Para conocer la influencia de la temperatura en la limpieza del almidón seco mediante aplicación de corriente continua se realizaron ensayos de lavado a 10, 20, 40 y 60 °C utilizando una disolución acuosa de NaOH pH 13 como baño de lavado y comparando los resultados obtenidos aplicando 5 V de corriente continua con los obtenidos mediante inmersión de las esferas sin conexión alguna al generador. En la Figura 4.26 se muestran los resultados de los ensayos de lavado obtenidos al cabo de 10 minutos y 20 minutos de operación. Las barras de error representan la desviación standard de un mínimo de tres repeticiones.

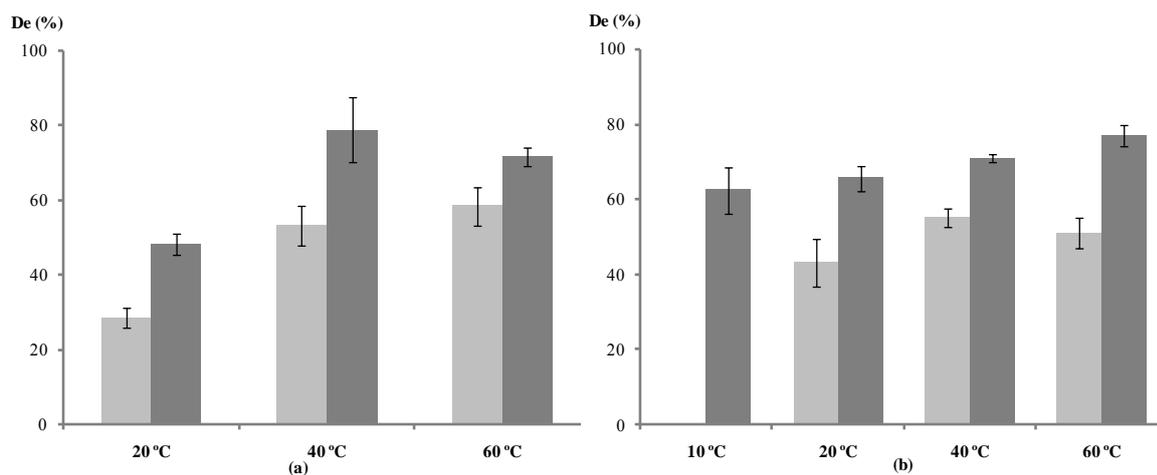


Figura 4.26. Influencia de la temperatura y tiempo de operación sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua. pH 13. Tiempo de operación: (a) 10 minutos, (b) 20 minutos. Sin aplicación de corriente (■), Corriente continua de 5 V (■)

Como cabía esperar, el aumento de temperatura incrementa de forma general los resultados de detergencia tanto en los ensayos realizados sin aplicar corriente como cuando se aplica un potencial de 5 V. Centrando el análisis en estos últimos resultados, en los lavados realizados a 10 minutos (Figura 4.26 (a)) se observa que el aumento progresivo de temperatura tiene un efecto más acusado sobre la detergencia que el obtenido cuando la duración del lavado es de 20 minutos (Figura 4.26 (b)). Concretamente, en lavados realizados durante 10 minutos a un potencial de 5 V, el aumento de temperatura de 20 °C a 60 °C elevó en promedio la detergencia un 49%, mientras que el incremento promedio fue sólo del 17% cuando la duración del lavado fue de 20 minutos en las mismas condiciones. En los ensayos a mayor temperatura (60 °C) el aumento de la detergencia al aplicar un voltaje de 5 V sigue siendo relevante, incrementándose ésta un 23% en los ensayos de 10 minutos y un 51% en los de 20 minutos de duración con respecto a los ensayos sin aplicación de corriente continua.

De la observación de la Figura 26 (a) y (b) se deduce que el efecto positivo que tiene el aumento de temperatura sobre la eficacia de lavado puede obtenerse prolongando la duración del ensayo, lo cual repercute en una reducción del coste energético del proceso. Aun así, un tiempo de lavado de 20 minutos es inferior a la duración habitual de los procesos de lavado en la industria alimentaria, en los que

sólo el ciclo de lavado alcalino puede durar entre 10 y 30 minutos, y dependiendo de la suciedad a limpiar, puede extenderse hasta los 60 minutos (Moerman *et al.*, 2014).

Como conclusión estos resultados permiten afirmar que mediante la aplicación de un potencial de 5 V de corriente continua se pueden conseguir óptimos valores de detergencia con soluciones alcalinas a temperatura ambiente (20°C) utilizando tiempos de lavado de 20 minutos.

4.3.1.3 Influencia del pH

Los procesos de limpieza y desinfección que hacen uso de la electrólisis del agua utilizan soluciones tanto ácidas como básicas en función del tipo de suciedad y requerimientos de la superficie a limpiar (Chen, 2006; Zaki, 2007). Por ello se consideró adecuado el estudio de la limpieza electroquímica del almidón seco utilizando soluciones en un rango de pH de 1 a 13, ensayando concretamente soluciones de pH 1, 7, 10 y 13 preparadas según lo descrito en los apartados 2.8.2 y 2.9. Las condiciones experimentales fueron las consideradas como óptimas en apartados anteriores: potencial de 5 V durante 20 minutos a 20 °C. Los resultados de dichos ensayos se mostraron en la Tabla 3.37 y se representan en la siguiente figura.

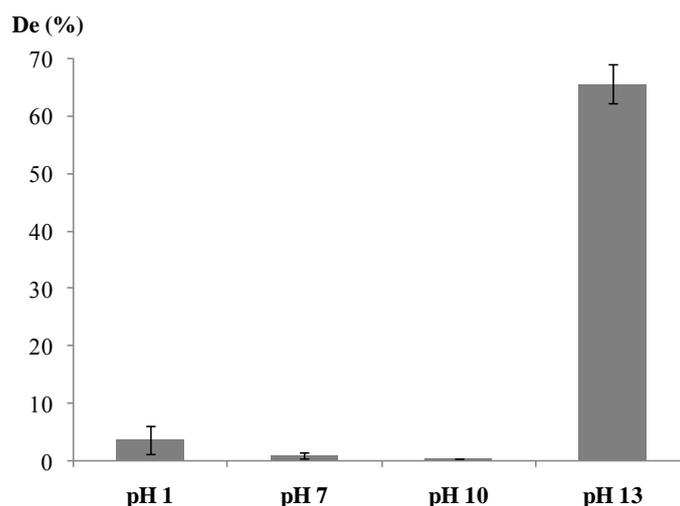


Figura 4.27. Influencia del pH de la solución de lavado sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua (5 V, 20 min, 20 °C). Las barras de error representan la desviación standard de un mínimo de tres repeticiones.

Los resultados obtenidos en el dispositivo de electrolimpieza a pH=7 y pH=10 son consistentes con los proporcionados por el dispositivo BSF, en el cual se realizaron ensayos de lavado con soluciones de pH 7 y 10 obteniendo una detergencia próxima a cero en todos los casos (ver Tabla 3.10 y Figura 4.12). La aplicación de corriente continua en el lavado de almidón seco con soluciones de estos valores de pH no mejora la detergencia, que sigue siendo insignificante en comparación con los resultados obtenidos a pH 13. En el apartado 4.1.2.1 ya se ha discutido la influencia de los álcalis sobre la estructura interna del almidón y cómo el tratamiento alcalino reduce el grado de polimerización y favorece su solubilidad (Jackson *et al.*, 1998; Han, y Lim, 2004; Lai *et al.*, 2004) dando lugar a importantes valores de detergencia. Estos resultados se ven significativamente incrementados al aplicar una corriente continua entre los dos polos sumergidos en la solución alcalina, como se puede observar en la Figura 4.24.

Con respecto al efecto de los ácidos sobre el almidón, éstos se utilizan para la producción de almidones modificados por medio de hidrólisis ácida (generalmente en presencia de alcoholes) si bien las condiciones para favorecer la ruptura de los enlaces glicosídicos implican elevadas temperaturas y tiempos de reacción (Betancur y Chel, 1997; Yiu *et al.*, 2008). La baja detergencia obtenida en los ensayos a pH 1 (sólo un 4%) parece ser debida a las suaves condiciones utilizadas en este estudio (20 °C, tiempo de lavado de 20 minutos), insuficientes para dar lugar a la hidrólisis ácida. La aplicación de corriente continua en esta solución ácida y con estas condiciones de ensayo tampoco proporciona resultados significativos en la detergencia.

4.3.1.4 Influencia del mojado previo

Se realizaron ensayos de lavado con un tiempo de mojado de las esferas sucias en la solución pH 13 (de 10 o 20 minutos) previo a la aplicación de corriente continua, con el fin de determinar si el hinchamiento y degradación alcalina del sustrato producido durante ese periodo de mojado previo proporcionaba mejores resultados de detergencia en comparación con los ensayos descritos en 4.3.1.1. Para ello se utilizaron de nuevo las condiciones experimentales consideradas óptimas (aplicación de 5 V, 20 °C) en ensayos con aplicación de corriente durante 10 y 20 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 4.28 en comparación con la

detergencia obtenida en los ensayos de la misma duración sin mojado previo (en ausencia de corriente y con 5 V).

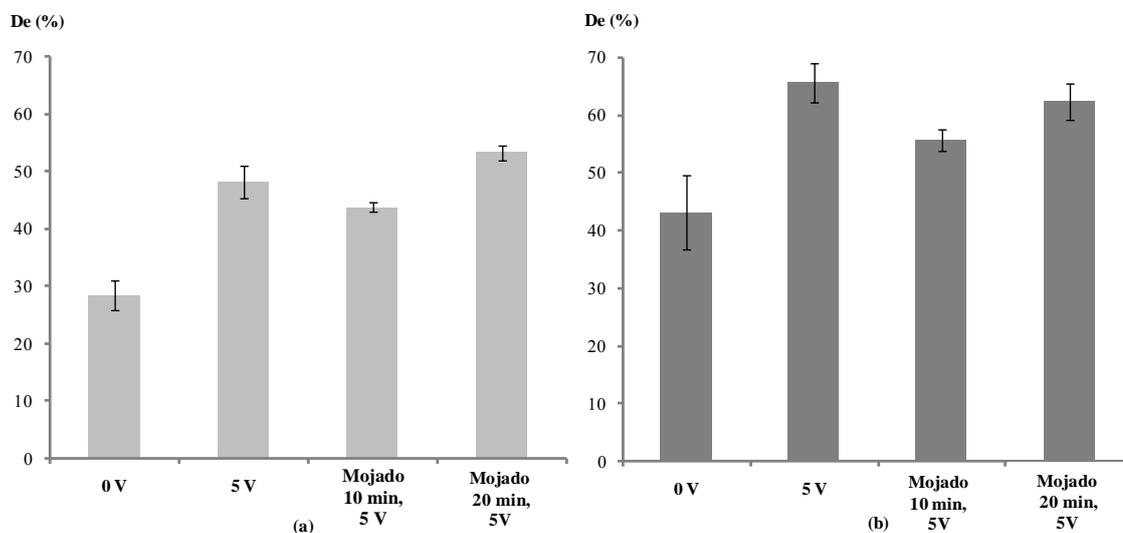


Figura 4.28. Influencia del tiempo de mojado previo sobre la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante aplicación de corriente continua (20°C, pH 13, 5 V). Tiempo de lavado: a) 10 minutos, b) 20 minutos

Se observa que cuando el tiempo de mojado previo es de 10 minutos no se obtienen mejoras en la detergencia, ni en ensayos de 10 ni de 20 minutos de duración. Cuando el tiempo de mojado previo es de 20 minutos la detergencia aumenta en los ensayos de 10 minutos de duración, si bien ese efecto no tiene lugar en los ensayos de lavado de 20 minutos. A la luz de estos resultados se concluye que el periodo de mojado previo en el proceso de electrolimpieza a 5 V no favorece el lavado en las condiciones experimentales fijadas.

4.3.2 Análisis de la influencia de los tensioactivos en el proceso de lavado mediante electrolimpieza

El estudio de los factores que afectan al proceso de lavado de almidón seco mediante electrolimpieza se completó con ensayos de lavado en las condiciones consideradas óptimas, obtenidas en el apartado anterior 4.3.1, utilizando como solución de lavado NaOH pH 13 junto con distintos tensioactivos no iónicos y aniónicos en concentración 1.0 g/L (expresada en base seca). Los resultados medios de estos ensayos se presentaron en la Tabla 3.42.

Para determinar si las diferencias obtenidas entre los distintos tensioactivos son estadísticamente relevantes se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a los valores de detergencia con cada una de las soluciones de lavado estudiadas. Su resultado se muestra en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18. Lavado por aplicación de corriente continua (20 °C, 5 V, 20 min.) Análisis de la varianza de la detergencia de soluciones de NaOH pH 13 en ausencia y presencia de tensioactivos

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
Entre grupos	1760.21	7	251.46	17.03	0.0000
Intra grupos	295.25	20	14.76		
Total	2055.47	27			

Se obtiene que el p-valor de la prueba es 0.0000, mucho menor que 0.05y por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las detergencias obtenidas por electrolimpieza con los 8 tensioactivos estudiados con un nivel del 95.0% de confianza.

A continuación, al igual que en el apartado 4.2.3, se aplicó el procedimiento de mínima diferencia significativa de Fisher a las detergencias obtenidas con soluciones NaOH pH 13 en ausencia y presencia de tensioactivos con el fin de determinar si existen grupos homogéneos de tensioactivos en cuanto a su eficacia de lavado por el método de electrolimpieza. En la Tabla 4.19 se muestran la comparación por parejas que determina las diferencias significativas y la formación de grupos homogéneos. Mediante asterisco se indican los pares de conjuntos cuyas medias muestrales son significativamente diferentes con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 4.19. Lavado por aplicación de corriente continua (20 °C, 5 V, 20 min.)
Diferencias mínimas y diferencias estimadas entre cada par de medias de
detergencia de soluciones NaOH pH 13 en presencia y ausencia de tensioactivos**

Contraste	Dif. mínima	Dif. estimada	Significación
Sin tensioactivo – AE	6.5440	-22.0600	*
Sin tensioactivo – APG	5.8531	-8.5207	*
Sin tensioactivo– PGE-OE2	6.5440	-23.2000	*
Sin tensioactivo – PGE-OE17	6.5440	-23.0767	*
Sin tensioactivo – ECA-OE3	6.5440	-19.2100	*
Sin tensioactivo – ECA-OE10	6.5440	-15.4533	*
Sin tensioactivo – LAS	5.8531	-7.0827	*
AE – APG	5.8531	13.5393	*
AE - PGE-OE2	6.5440	-1.1400	
AE – PGE-OE17	6.5440	-1.0200	
AE – ECA-OE3	6.5440	-2.8500	
AE – ECA-OE10	6.5440	6.60667	*
AE – LAS	5.8531	14.9773	*
APG – PGE-OE2	5.8531	-14.6793	*
APG – PGE-OE17	5.8531	-14.5560	*
APG – ECA-OE3	5.8531	-10.6893	*
APG – ECA-OE10	5.8531	-6.9327	*
APG – LAS	5.0690	1.4380	
PGE-OE2 – PGE-OE17	6.5440	0.1233	
PGE-OE2 – ECA-OE3	6.5440	3.9900	
PGE-OE2 – ECA-OE10	6.5440	7.7467	*
PGE-OE2 – LAS	5.8531	16.1173	*
PGE-OE17 – ECA-OE3	6.5440	3.8667	
PGE-OE17 – ECA-OE10	6.5440	7.6233	*
PGE-OE17 – LAS	5.8531	15.9940	*
ECA-OE3 – ECA-OE10	6.5440	3.7567	
ECA-OE3 – LAS	5.8531	12.1273	*
ECA-OE10 – LAS	5.8531	8.3707	*

A partir de estas diferencias la prueba de Fisher detecta cuatro grupos homogéneos de soluciones de lavado (nombrados *a*, *b*, *c* y *d* en orden de menor a mayor valor de detergencia media), entre los cuales se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. En la Figura 4.29 se representa la detergencia media y desviación standard (mediante barra de error) de cada una de las formulaciones de lavado estudiadas, indicando los grupos homogéneos en los que se incluye cada una.

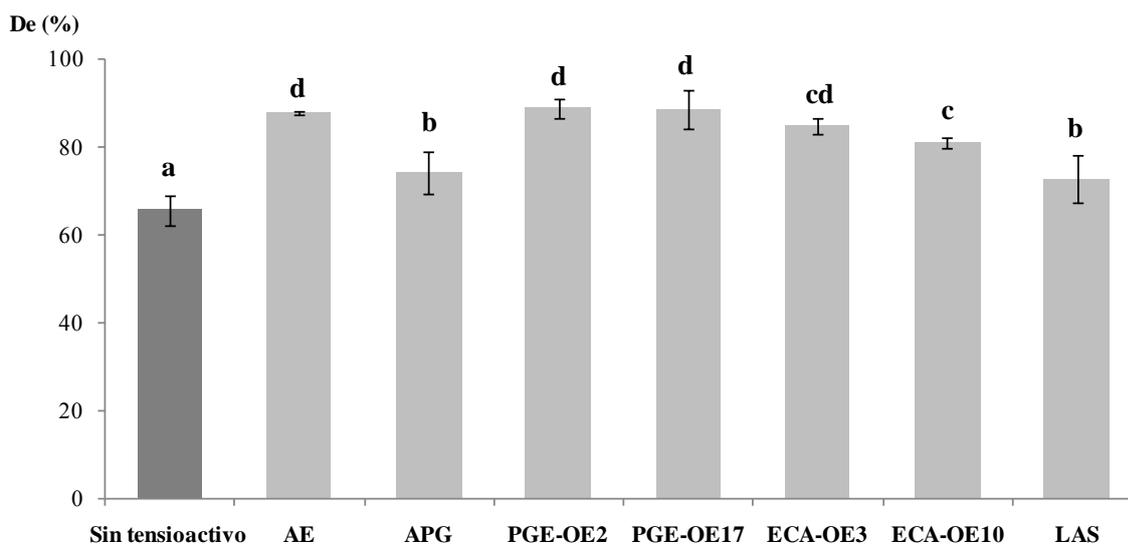


Figura 4.29. Lavado por aplicación de corriente continua (20 °C, 5 V, 20 min.). Detergencia en soluciones de NaOH pH 13, influencia de la presencia (1.0 g/L) de tensioactivo.(La barra de error representa la desviación standard. Las letras *a-d* denotan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Fisher al 95% de nivel de confianza)

Los resultados del test de Fisher indican que la detergencia de la solución NaOH pH13 constituye un grupo estadísticamente diferente a la detergencia obtenida con el resto de disoluciones. Por tanto, una primera conclusión de este análisis es que todos los tensioactivos estudiados mejoran de forma significativa la detergencia de una solución NaOH pH 13 cuando se aplica corriente continua en las condiciones descritas.

Dentro de los tensioactivos estudiados los no iónicos AE y los dos ésteres de glicerina polietoxilados (PGE-OE2 y PGE-OE17) así como el tensioactivo aniónico ECA-OE3 son los que proporcionan un aumento mayor de la detergencia, obteniendo valores que rozan el 90%. El dispositivo de electrolimpieza constituye un método novedoso ya patentado (Vicaria *et al.*, 2014). Estos resultados constituyen un punto de partida interesante para un estudio posterior de los mecanismos y la eficacia de lavado de diversas soluciones detergentes cuando al sistema sustrato-baño se le aplica corriente continua.

Capítulo 5

Conclusiones

A continuación se enumeran las conclusiones más relevantes obtenidas de la investigación desarrollada a lo largo de la presente Tesis Doctoral:

1. Los tensioactivos no iónicos estudiados muestran distintos resultados en su interacción con partículas de sílice y magnetita. Mientras el AE (alcohol etoxilado) se adsorbe sobre todas las partículas estudiadas, no se observa interacción entre el tensioactivo APG (alquilpoliglucósido) y las partículas de sílice. La magnitud de la interacción depende de la superficie específica y el diámetro de las partículas, detectándose mayor interacción con las micropartículas de sílice Sipernat 50 (S50). Cuando la concentración de S50 es de 1.0 g/L se adsorbe un 36% del tensioactivo AE presente inicialmente en la solución acuosa. Se establecen por tanto las micropartículas S50 como referencia para el estudio de la eficacia de lavado de soluciones detergentes con partículas en el resto del trabajo.
2. Se ha modelizado la detergencia alcanzada en el dispositivo de limpieza BSF a los 45 minutos de lavado con soluciones a pH constante, con adición de AE y de APG y con partículas S50 mediante un diseño de experimentos, analizando las variables concentración de partícula (CMP), pH y caudal (Q). En los tres diseños realizados la detergencia se ajusta a un modelo empírico lineal con interacción entre factores y con adición de un término cuadrático de pH.
3. La detergencia de almidón seco adherida a acero inoxidable está fuertemente condicionada por el pH de la solución de lavado, adquiriendo valores significativos tan solo con soluciones de pH 13, independientemente de la presencia de tensioactivos. El caudal también tiene un efecto positivo sobre la detergencia en los tres diseños realizados, aunque de menor magnitud. Sin embargo, la concentración de partículas S50 tiene diferentes efectos en función de la solución estudiada. En disoluciones con pH comprendido entre 7 y 13 en ausencia de tensioactivo no tiene efecto alguno sobre la detergencia, mientras que en presencia de AE tiene un efecto negativo, descendiendo conforme aumenta la CMP. La adsorción de AE sobre las partículas S50 no contribuye por tanto a la eficacia del proceso de

lavado, sino que la reduce. Por último, se observa un aumento de la detergencia de soluciones que contienen APG, aumentando este efecto al incrementarse la CMP y el caudal. El óptimo de detergencia se obtiene con soluciones de lavado que incorporan APG en las condiciones de concentración de S50, pH y caudal más elevadas.

4. Los perfiles de detergencia en función del tiempo de lavado muestran que la influencia del pH y del caudal sobre la detergencia son patentes desde los primeros minutos de ensayo. Cuando a las soluciones de lavado pH 13 estudiadas se les añade partículas S50 en concentración 0.1 g/L no se observan efectos claros sobre la detergencia, a diferencia de los resultados obtenidos cuando $CMP=1.0$ g/L. Por lo tanto se recomienda utilizar una concentración cercana a este valor para conseguir influir en la eficacia de lavado, obteniéndose resultados óptimos para la solución pH 13 con APG y $CMP=1.0$ g/L.
5. La enzima α -amilasa utilizada es estable en soluciones de tensioactivos aniónicos (lineal alquilbenceno sulfonato (LAS) y dos ácidos alquil éter carboxílicos (ECA)) y no iónicos (alcohol etoxilado (AE), alquilpoliglucósido (APG) y dos ésteres de glicerina polietoxilados (PGE)). El análisis estadístico realizado no muestra diferencias significativas en la actividad enzimática en ausencia y en presencia de cada uno de los tensioactivos ensayados.
6. El lavado de almidón seco adherido a acero inoxidable mediante soluciones de α -amilasa (pH 7) en el dispositivo BSF depende fuertemente de la temperatura y concentraciones de enzima utilizadas. Las condiciones de lavado óptimas dependerán de un análisis que evalúe el coste de la enzima y la eficacia de lavado que se pretende conseguir. La adición de las partículas S50 a la solución enzimática no ha tenido efectos significativos sobre la detergencia en los ensayos de lavado realizados.
7. La adición de tensioactivos, tanto aniónicos como no iónicos, a la solución de lavado con α -amilasa no mejora o incluso en algunos casos empeora la detergencia alcanzada para el almidón seco. En los ensayos a 40 °C la adición de los tensioactivos no iónicos AE y APG produce unos perfiles detergencia-tiempo prácticamente coincidentes con el de la solución

enzimática sin tensioactivos. A 60 °C se realizó un análisis estadístico para evaluar si existían diferencias significativas sobre la detergencia alcanzada a tiempo final entre la solución enzimática sin tensioactivos y con cada uno de los tensioactivos estudiados. Se encontró que ninguno de ellos mejoraba significativamente la detergencia de la solución sin tensioactivo. Los tensioactivos AE y el ácido alquil éter carboxílico ECA-OE₃ reducen el valor de detergencia final.

- 8.** Se ha aplicado corriente continua para llevar a cabo la limpieza de almidón seco adherido a acero inoxidable, poniéndose a punto un dispositivo de electrolimpieza. Se ha demostrado que la inmersión de las esferas sucias en solución pH 13 y su conexión al cátodo de un generador de corriente continua (voltajes entre 1 y 10 V) aumenta la detergencia de forma significativa con respecto a los ensayos de lavado sin corriente alguna.
- 9.** El uso de soluciones de pH inferior a 13 en el dispositivo de electrolimpieza para la eliminación de almidón seco no proporciona resultados satisfactorios. El incremento de temperatura sí tiene un efecto positivo sobre la detergencia, pero fundamentalmente en los ensayos de corta duración (10 minutos). Se han establecido unas condiciones óptimas de lavado de acuerdo con criterios de eficacia y ahorro energético: solución de lavado pH 13, voltaje 5V, tiempo de limpieza 20 minutos y 20 °C.
- 10.** El análisis estadístico realizado muestra que todos los tensioactivos ensayados añadidos a la solución pH 13 aumentan la detergencia en el dispositivo de electrolimpieza en las condiciones óptimas de lavado descritas en el punto anterior. En estas condiciones experimentales se alcanzan detergencias próximas al 90% con alcohol etoxilado (AE), los ésteres de glicerina polietoxilados (PGE-OE₂ y PGE-OE₁₇) y el ácido alquil éter carboxílico ECA-OE₃.

Chapter 6

Conclusions

Below the most important conclusions obtained from the research carried out in this Ph.D. Thesis are listed:

- 1.** The non ionic surfactants studied show different results with respect to their interaction with silica and magnetite particles. While the ethoxylated alcohol (AE) adsorbs on the surface of all the particles studied, no interaction is observed between the alkylpolyglucoside (APG) and the silica particles. The magnitude of the interaction depends on the specific surface and particle diameter, being observed a higher interaction with the silica microparticles Sipernat 50 (S50). When S50 concentration is 1.0 g/L a 36% of the initial concentration of the surfactant AE in the aqueous solution is adsorbed. Thus, the particles S50 are selected as a reference in this work for the study of the cleaning efficiency of detergent solutions with particles.
- 2.** A model for the detergency reached in the cleaning device BSF at 45 minutes with solutions with pH constant, with addition of AE and APG and including particles S50 has been developed by design of experiments. The three factors analyzed has been particle concentration (CMP), pH and flow rate (Q). In the three designs carried out detergency adjusts to an empirical lineal model with interaction between factors and with the addition of a quadratic term for pH.
- 3.** The detergency of dried starch adhered to stainless steel is strongly determined by the pH of the washing solution, reaching significant values only with pH 13 solutions, regardless of the presence of surfactants. Flow rate has a positive effect on detergency too, although in a lesser extent. Nevertheless, the concentration of particles S50 has different effects on detergency depending on the solution considered. In solutions with a pH value between 7 and 13 in absence of surfactants it doesn't have any effect, while in the presence of AE it has a negative effect which is more remarkable when CMP increases.
- 4.** Detergency profiles as a function of time show that the influence of pH and flow rate on detergency is noticeable since the beginning of the test. When particles S50 are added in a concentration of 0.1 g/L to detergent solutions

at pH 13 no noticeable effects in detergency can be observed, unlike cleaning tests with solutions with $\text{CMP} = 1.0 \text{ g/L}$. Thus, a concentration near this value is recommended when studying the influence of these particles on cleaning efficiency, obtaining optimal results with the pH 13 solution with APG and $\text{CMP} = 1.0 \text{ g/L}$.

5. The α -amylase enzyme used in this work is stable in anionic surfactant solutions (a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and two alkyl ether carboxylic acids (ECA)) and non ionic surfactant solutions (an ethoxylated alcohol (AE), an alkylpolyglucoside (APG) and two polyoxyethylene mono- and diglycerides (PGE)). The statistical analysis performed doesn't show significant differences in enzymatic activity either in absence or in presence of each one of the surfactants studied.
6. The washing process of dried starch adhered to stainless steel with α -amylase solutions (pH 7) in the BSF device has a strong dependence on temperature and the enzyme concentration used. Optimal cleaning conditions will be determined with the help of an analysis based on the enzyme cost and the cleaning efficiency wanted.
7. The addition of anionic or non ionic surfactants to cleaning solutions with α -amylase doesn't improve the detergency results obtained for dried starch, getting it worse in some cases. In cleaning tests at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ the addition of the non ionic surfactants AE and APG results in detergency-time profiles almost coincident with the profile obtained for the enzymatic solution without surfactants. A statistical analysis was performed with detergency results at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in order to assess the differences on detergency at the end of the test when used enzymatic solutions in absence and in presence of all the surfactants studied. It was found that none of them gave better results than obtained with the enzymatic solution without surfactants. Surfactants AE and the alkyl ether carboxylic acid ECA-OE₃ worsen final detergency results.
8. A direct current flow has been applied for cleaning dried starch adhered to stainless steel, setting up an electrocleaning device. It has been proved that the immersion of dried spheres on aqueous solutions with pH 13 and its

connection with the cathode of a direct current generator (voltage between 1 and 10 V) increase significantly the detergency with respect to cleaning tests without any direct current performed in the same device.

- 9.** The use of aqueous solutions with a pH value under 13 in the electrocleaning device doesn't get satisfactory results in the cleaning of dried starch. The increase in temperature values has a positive effect on detergency, but mainly in short length (10 minutes) cleaning tests. Optimal cleaning conditions have been set according to efficiency and energetic savings criteria: aqueous solution with pH 13, voltage 5 V, cleaning time 20 minutes and 20 °C.

- 10.** Statistical analysis performed show that all the surfactants tested when added to aqueous solution pH 13 increase detergency results in the electrocleaning device when the aforementioned optimal experimental conditions are used. In these experimental conditions detergency values near 90% has been obtained when used ethoxylated alcohol (AE), the two polyoxyethylene glicerine esters (PGE-OE2 and PGE-OE17) and the alkyl ether carboxylic acid ECA-OE3.

Referencias bibliográficas

- AENOR (1996). *UNE-EN ISO 862:1996. Agentes de superficie. Vocabulario.*
- Álvarez, M. (2004). La industria de los surfactantes: tendencias mundiales y perspectivas para Colombia. *Revista Palmas*, 25(especial,), 340-353.
- Amjad, Z., Hooley, J.P. (1994). Effect of antiscalants on the precipitation of calcium carbonate in aqueous solutions. *Tenside, Surfactants, Detergents*, 31(1), 12–17.
- Antony, N., Balachandran, S., Mohanan, P.V. (2013). Effect of Surfactants on Catalytic Activity of Diastase α -Amylase. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(4), 703–708. doi:10.1007/s11743-013-1531-8
- Aronson, M.P., Gum, M.L., Goddard, E.D. (1983). Behavior of surfactant mixtures in model oily-soil detergency studies. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(7), 1333–1339. doi:10.1007/BF02702113
- Atta, A.M., Al-Lohedan, H.A. (2014). Influence of Nonionic Rosin Surfactants on Surface Activity of Silica Particles and Stability of Oil in Water Emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(5), 1043–1053. doi:10.1007/s11743-014-1589-y
- Auerswald, D. (2000). Procedimientos de limpieza. En: Wildbrett, G. (Ed.) *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Augustin, W., Fuchs, T., Föste, H., Schöler, M., Majschak, J.-P., Scholl, S. (2010). Pulsed flow for enhanced cleaning in food processing. *Food and Bioproducts Processing*, 88(4), 384–391. doi:10.1016/j.fbp.2010.08.007
- Augustsson, P.-E., Olefjord, I., Olefjord, Y. (1986). Electrocleaning of cold rolled steel sheets. *Surface Engineering*, 2(4), 277–282. doi:10.1179/sur.1986.2.4.277
- Aveyard, R., Binks, B.P., Clint, J.H. (2003). Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102, 503–546. doi:10.1016/S0001-8686(02)00069-6

- Ayebah, B., Hung, Y.-C. (2005). Electrolyzed water and its corrosiveness on various surface materials commonly found in food processing facilities. *Journal of Food Process Engineering*, 28(3), 247–264. doi:10.1111/j.1745-4530.2005.00424.x
- Bari, M.L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., Isshiki, K. (2003). Effectiveness of Electrolyzed Acidic Water in Killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the Surfaces of Tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66(4), 542-548.
- Batra, A., Paria, S., Manohar, C., Khilar, K.C. (2001). Removal of surface adhered particles by surfactants and fluid motions. *AIChE Journal*, 47(11), 2557–2565. doi:10.1002/aic.690471118
- Becker, K., Haake, M. (2010). Patente WO 2010105816 A1. *Cleaning agent containing carbamide and/or at least a derivative thereof*. Solicitante: Bbt Bergedorfer Biotechnik GmbH, Alemania.
- Bénézech, T., y Lalande, M. (2002). Sistemas de limpieza CIP. En: Leveau, J.Y., y Bouix, M. (Eds.) *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. 1ª ed. Madrid, Mundi-Prensa.
- Bernfeld, P. (1955). [17] Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149–158. doi:10.1016/0076-6879(55)01021-5
- Bertoft, E. (2004). Analysing starch structure. En: Eliasson, A.C. (Ed.) *Starch in food: structure, function and applications*. CRC Press y Woodhead Publishing Limited.
- Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 17–25. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.12.016
- Betancur, A.D., Chel, G.L. (1997). Acid hydrolysis and characterization of *Canavalia ensiformis* starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4237-4241. doi: 10.1021/jf970388q
- Biliaderis, C.G. (2009). Structural transitions and related physical properties of starch. En: Whistler R.L., BeMiller J.N. (Eds.) *Starch: Chemistry and Technology*. 3ª ed. New York, NY: Academic Press.

- Binks, B.P. (2002). Particles as surfactants-similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1-2), 21–41. doi:10.1016/S1359-0294(02)00008-0
- Binks, B.P., Horozov, T.S. (2005). Aqueous Foams Stabilized Solely by Silica Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 117(24), 3788–3791. doi:10.1002/ange.200462470
- Bird, M.R., Fryer, P.J. (1991). Experimental study of the cleaning of surfaces fouled by whey proteins. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 69(1), 13–21.
- Bobé, U., Hofmann, J., Sommer, K., Beck, U., Reiners, G. (2007). Adhesion – where cleaning starts. *Trends in Food Science & Technology* 18, 36-39.
- BOE (1999). Real Decreto 770/1999 de 7 de Mayo por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes limpiadores. BOE nº 118 de 18 de Mayo de 1999.
- Borghì, C.C., Fabbri, M., Fiorini, M., Mancini, M., Ribani, P.L. (2011). Magnetic removal of surfactants from wastewater using micrometric iron oxide powders. *Separation and Purification Technology*, 83, 180–188. doi:10.1016/j.seppur.2011.09.042
- Boulané-Petermann, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10(4), 275–300. doi:10.1080/08927019609386287
- Bourne, M.C., Jennings, W.G. (1963). Kinetic studies of detergency. II. Effect of age, temperature, and cleaning time on rates of soil removal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 40(10), 523–530. doi:10.1007/BF02822457
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- Bravo, V., Jurado, E., Reyes, A., García-López, A., Bailón, R., Cuevas, M. (2005). Determination of average molecular weight of commercial surfactants: alkylpolyglucosides and fatty-alcohol ethoxylates. *Journal of Surfactants and Detergents*, 8(3), 341-346. doi: 10.1007/s11743-005-0366-y
- Bravo, V., Jurado, E., Martínez-Gallegos, J.F., Reyes, A., García, A.I., Cabral, J.M.S., et al. (2006). Modification of the activity of α -amylase from *Bacillus licheniformis* by several surfactants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5). doi:10.2225/vol9-issue5-fulltext-16
- Bravo Rodríguez, V., Jurado Alameda, E., Martínez Gallegos, J.F., Reyes Requena, A., García López, A.I. (2008). Formation of complexes between alkyl polyglycosides and potato starch. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 65(1), 92–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.03.001
- Brown, D.G., Jaffé, P.R. (2001). Spectrophotometric Assay of POE Nonionic Surfactants and its Application to Surfactant Sorption Isotherms. *Environmental Science & Technology*, 35(10), 2022–2025. doi: 10.1021/es001807u
- Broze, C. (1995). Solubilization and detergency. En: Christian, S.D., y Scamehorn, J.F. (Eds.) *Solubilization in surfactant aggregates*. 493-Marcel Dekker, N.Y.
- Buck, J.W., van Iersel, M.W., Oetting, R.D., Hung, Y.-C. (2002). In Vitro Fungicidal Activity of Acidic Electrolyzed Oxidizing Water. *Plant Disease*, 86(3), 278–281. doi:10.1094/PDIS.2002.86.3.278
- Buschmann, N., Wodarczak, S. (1995). Analytical methods for alkylpolyglucosides. Part 1: Colorimetric determination. *Tenside, surfactants, detergents*, 32(4), 336-339.
- CE (1999). Directiva 1999/45/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de mayo de 1999 sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la clasificación, el envasado y el etiquetado de preparados peligrosos. (DO L 200, 30.07.1999).

- CE (2000). Reglamento (CE) nº 1980/2000 del Parlamento Europeo y del consejo de 17 de Julio de 2000 relativo a un sistema comunitario revisado de concesión de etiqueta ecológica. (DO L 237, 21.09.2000).
- CE (2004). Detergents Ingredients Database (DID-list) Part A. List of ingredients June 2004.
- CE (2004). Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes. (DO L 104, 08.04.2004).
- CE (2014).Detergents Ingredients Database (DID-list) Part A. List of ingredients version 2014.1.
- CESIO (2012).*CESIO Statistics 2012*.European Committee of Organic Surfactants and their Intermediates.
- Chen, X.D. (2006). Patente US20060108234 A1.*Electrochemical process and apparatus*. Solicitante: Xiao Dong Chen (Nueva Zelanda).
- Chengara, A., Nikolov, A.D., Wasan, D.T., Trokhymchuk, A., Henderson, D. (2004). Spreading of nanofluids driven by the structural disjoining pressure gradient.*Journal of Colloid and Interface Science*, 280(1), 192–201. doi:10.1016/j.jcis.2004.07.005
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
- Cleaver, J., Yates, B. (1973).Mechanism of detachment of colloidal particles from a flat substrate in a turbulent flow.*Journal of Colloid and Interface Science*, 44(3), 464–474. doi:10.1016/0021-9797(73)90323-8
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., Tang, M.C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527–1534. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.09.016
- da Silveira, L. (1997). A note on the poultice cleaning of feathers using Laponite RD gel. *Studies in conservation*, 42(1), 11-16.doi:10.1179/sic.1997.42.1.11

- Delory, G.E., King, E.J. (1945). A sodium carbonate-bicarbonate buffer for alkaline phosphatases. *Biochemical Journal*, 39(3), 245.
- Dean, A.M., Voss, D.T. (1999). *Design and analysis of experiments*. Springer-Verlag New York, Inc.
- Detry, J.G., Sindic, M., Deroanne, C. (2010). Hygiene and cleanability: a focus on surfaces. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(7), 583–604. doi:10.1080/10408390802565913
- Detry, J.G., Sindic, M., Servais, M.J., Adriaensen, Y., Derclaye, S., Deroanne, C., Rouxhet, P.G. (2011). Physico-chemical mechanisms governing the adherence of starch granules on materials with different hydrophobicities. *Journal of Colloid and Interface Science*, 355(1), 210–21. doi:10.1016/j.jcis.2010.11.052
- Dev, S.R.S., Demirci, A., Graves, R.E., Puri, V.M. (2014). Optimization and modeling of an electrolyzed oxidizing water based Clean-In-Place technique for farm milking systems using a pilot-scale milking system. *Journal of Food Engineering*, 135, 1–10. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.02.019
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
- Epstein, N. (1978). Fouling in Heat Exchangers. In *International Heat Transfer Conference 6*. Begel House Inc. Tomado de (junio 2016): <http://dl.begellhouse.com/references/1bb331655c289a0a,15aac851609f970c,2d80d27650338080.html>
- Eskandar, N.G., Simovic, S., Prestidge, C.A. (2011). Interactions of hydrophilic silica nanoparticles and classical surfactants at non-polar oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(1), 217–25. doi:10.1016/j.jcis.2011.02.056
- Fabrizio, K., Sharma, R., Demirci, A., Cutter, C. (2002). Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce Salmonella species on poultry. *Poultry Science*, 81(10), 1598–1605. doi:10.1093/ps/81.10.1598

- Fabrizio, K.A., Cutter, C.N. (2003). Stability of Electrolyzed Oxidizing Water and Its Efficacy against Cell Suspensions of Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1379-1384.
- Fernández, A., Salager, J.-L., Scorzza, C. (2004). *Cuaderno FIRP S303-PP: Surfactantes IV. Surfactantes noiónicos*. Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería Química, Mérida, Venezuela.
- Flynn, B.P., Winetzky, D.S., Evans, G.D. (1988). Patente US4720351A. *Multi functional laundry product and employment of the same during fabric laundering*. Solicitante: Purex Corporation, EEUU.
- Föste, H., Schöler, M., Majschak, J.-P., Augustin, W., & Scholl, S. (2013). Modeling and Validation of the Mechanism of Pulsed Flow Cleaning. *Heat Transfer Engineering*, 34(8-9), 753–760. doi:10.1080/01457632.2012.741499
- Fryer, P.J., Asteriadiou, K. (2009). A prototype cleaning map: A classification of industrial cleaning processes. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6-7), 255–262. doi:10.1016/j.tifs.2009.03.005
- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, 41(5), 583-603.
- García, M.T., Ribosa, L., Campos, E., Sánchez, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere*, 35(3), 545-556. doi:10.1016/S0045-6535(97)00119-7
- Gerhards, C. y Schmid, A. (2013). Assessing the cleanability of stainless steel surfaces – development of a testing method for starch and protein based soils. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 3, 9-14.
- Gillham, C.R., Fryer, P.J., Hasting, A.P.M., Wilson, D.I. (1999). Cleaning-in-Place of Whey Protein Fouling Deposits. *Food and Bioproducts Processing*, 77(2), 127–136. doi:10.1205/096030899532420
- Goddard, E. D. (1986). Polymer-surfactant interaction Part I. uncharged water-soluble polymers and charged surfactants. *Colloids and Surfaces*, 19(2-3), 255–300. doi:10.1016/0166-6622(86)80340-7

- Gómez Herrera, C. (1996). Detergencia. Sus principales mecanismos. *Grasas y Aceites*, 47(6), 419–435. doi:10.3989/gya.1996.v47.i6.890
- Goode, K.R., Asteriadou, K., Robbins, P.T., Fryer, P.J. (2013). Fouling and Cleaning Studies in the Food and Beverage Industry Classified by Cleaning Type. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 121–143. doi:10.1111/1541-4337.12000
- Gormsen, E., Marcussen, E., Damhus, T. (1998). Enzymes. En: Showell, M.S. (Ed.) *Powdered detergents*. Surfactant Science Series, 71. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, p. 137-164.
- Gudmundsson, M., Eliasson, A.-C. (1990). Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers. *Carbohydrate Polymers*, 13(3), 295–315. doi:10.1016/0144-8617(90)90061-V
- Gudmundsson, M. (1992). Effects of an added inclusion-amylose complex on the retrogradation of some starches and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 17(4), 299–304. doi:10.1016/0144-8617(92)90173-N
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599–1616. doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- Hagihara, Y., Hong, D.-P., Hoshino, M., Enjoji, K., Kato, H., Goto, Y. (2002). Aggregation of β 2 -Glycoprotein I Induced by Sodium Lauryl Sulfate and Lysophospholipids. *Biochemistry*, 41(3), 1020–1026. doi:10.1021/bio15693q
- Han, J.-A., Lim, S.-T. (2004). Structural changes in corn starches during alkaline dissolution by vortexing. *Carbohydrate Polymers*, 55(2), 193–199. doi:10.1016/j.carbpol.2003.09.006
- Hati, S. (2012). Electrolyzed Oxidized Water (EOW): Non-Thermal Approach for Decontamination of Food Borne Microorganisms in Food Industry. *Food and Nutrition Sciences*, 03(06), 760–768. doi:10.4236/fns.2012.36102
- HERA (2009). *Alcohol Ethoxylates. Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products*. Version 2.0.

- Herbots, I., Kottwitz, H., Reilly, P.J., Antrim, R.L., Burrows, H., Lenting, H.B.M. *et al.* (2011). Enzymes 4.Non-food applications.En: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Vol. 12, p. 709-782.
- Hill, K., von Rybinski, W., Stoll, G. (1997). *Alkyl Polyglucosides – Technology, Properties and Applications*.VCH, Weinheim, Germany.
- Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.-K., Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71–79. doi:10.1016/j.bej.2009.07.005
- Holah, J.T., Betts, R.P., Thorpe, R.H. (1989). The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene.*International Biodeterioration*, 25(1-3), 147–153. doi:10.1016/0265-3036(89)90040-7
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants.*Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(2), 148–159. doi:10.1016/S1359-0294(01)00074-7
- Hoshino, E., Tanaka, A. (2003). Enhancement of Enzymatic Catalysis of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase by Nonionic Surfactant Micelles.*Journal of Surfactants and Detergents*,6(4), 299–303.doi:10.1007/s11743-003-0273-2
- Hsu, S.-Y.(2005). Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water.*Journal of Food Engineering*, 66(2), 171–176. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.03.003
- Huang, Y.-R., Hung, Y.-C., Hsu, S.-Y., Huang, Y.-W., Hwang, D.-F.(2008). Application of electrolyzed water in the food industry.*Food Control*, 19(4), 329–345. doi:10.1016/j.foodcont.2007.08.012
- Hui, Y., Russell, J.C., Whitten, D.G. (1983). Photochemical reactivity in organized assemblies. 33. Host-guest interactions in amylose inclusion complexes: photochemistry of surfactant stilbenes in helical cavities of amylose. *Journal of the American Chemical Society*, 105(5), 1374–1376. doi:10.1021/ja00343a053

Hunter, T.N., Pugh, R.J., Franks, G.V, Jameson, G.J. (2008). The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 137(2), 57–81. doi:10.1016/j.cis.2007.07.007

INE (2016). *Encuesta Industrial de Productos*. Web: www.ine.es. Agosto 2016.

Jackson, D.S., Waniska, R.D., Rooney, L.W. (1988). Characterization of starch cooked in alkali by aqueous high-performance size-exclusion chromatography. *Cereal Chemistry*, 65(6), 493-496.

Jadeja, R., Hung, Y.-C. (2014). Efficacy of near neutral and alkaline pH electrolyzed oxidizing waters to control Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium DT 104 from beef hides. *Food Control*, 41(1), 17–20. doi:10.1016/j.foodcont.2013.12.030

Jaiswal, N., Prakash, O. (2011). Immobilization of soybean α -amylase on gelatin and its application as a detergent additive. *Asian Journal of Biochemistry*, 6(4), 337-346. doi:10.3923/ajb.2011.337.346

Jennings, W.G. (1965). *Advances in Food Research Volume 14*. *Advances in Food Research* (Vol. 14). Elsevier. doi:10.1016/S0065-2628(08)60151-2

Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 210–8. doi:10.1016/j.pbi.2003.12.001

Johansson, I., Svensson, M. (2001). Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(2), 178–188. doi:10.1016/S1359-0294(01)00076-0

Jurado, E., Bravo, V., Bailón, R., Núñez, J., Altmajer, D. (2002a). Método BSF (Baño-Sustrato-Flujo) y dispositivo para evaluación de la eficacia detergente y dispersante de tensioactivos, de coadyuvantes de la detergencia y de composiciones de detergentes de superficies duras. Patente Española P2002002/02364.

Jurado, E., Fernández, M., Núñez, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2002b). Comparison and use of methods for the determination of non-ionic surfactants in biodegradation processes. *Tenside, surfactants, detergents*, 39(5), 154-159.

- Jurado, E., Bravo, V., Bailón, R., Núñez, J., Altmajer, D. (2003). Bath-substrate-flow method for evaluating the deterative and dispersant performance of hard-surface detergents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(19), 4303-4310. doi: 10.1021/ie030122a
- Jurado, E., Bravo, V., Bailón, R., García-Román, M., Fernández-Arteaga, A. (2004). Application of the statistical design of experiments and the Bath-Substrate-Flow method in formulating detergents for hard surfaces. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 128, 270-272. doi: 10.1007/b97105
- Jurado, E., Bravo, V., Núñez-Olea, J., García-Román, M., Fernández-Arteaga, A. (2006). Enzyme-based detergent formulas for fatty soils and hard surfaces in a continuous-flow device. *Journal of Surfactants and Detergents*, 9(1), 83-90. doi:10.1007/s11743-006-0379-6
- Jurado, E., Bravo, V., Bailón, R., Núñez, J., Altmajer, D. (2007). ES Patente N° 200701880. *Detergentes para superficies duras*. Solicitante: Universidad de Granada.
- Jurado, E., García-Román, M., Luzón, G., Altmajer-Vaz, D., Jiménez-Pérez, J.L. (2011a). Optimization of lipase performance in detergent formulations for hard surfaces. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(20), 11502-11510. doi: 10.1021/ie201486a
- Jurado, E., Bravo, V., Bailón, R., Núñez, J., Altmajer-Vaz, D. (2011b). Fatty soils removal from hard surfaces in a clean-in-place system. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4), 1053-1070. doi: 10.1111/j.1745-4530.2009.00527.x
- Jurado, E., Bravo, V., Altmajer-Vaz, D., Curto, R. de C. (2011c). Effectiveness of starch removal in a Bath-Substrate-Flow (BSF) device using surfactants and α -amylase. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 647-653. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.07.031
- Jurado, E., Vicaria, J. M., García-Martín, J. F., García-Román, M. (2012a). Wettability of Aqueous Solutions of Eco-Friendly Surfactants (Ethoxylated Alcohols and Polyoxyethylene Glycerin Esters). *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(3), 251-258. doi:10.1007/s11743-011-1312-1

- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Lechuga, M., Ríos, F. (2012b). Environmental Impact of Ether Carboxylic Derivative Surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(1), 1–7. doi:10.1007/s11743-011-1278-z
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Ríos, F., Lechuga, M. (2013). Aerobic biodegradation of surfactants. En: Chamy, R.; Rosenkranz, F. (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*; InTech, Rijeka, Croatia, 63-81.
- Jurado, E., Altmajer-Vaz, D., García-Román, M., Jiménez-Pérez, J.L. (2014). Study of heat-denatured whey protein removal from stainless steel surfaces in clean-in-place systems. *International Dairy Journal*, 38(2), 195-198. doi:10.1016/j.idairyj.2014.01.006
- Jurado, E., Altmajer, D., Garcia, M., Siqueira, R. de C. (2015). Cleaning of Starchy Soils in Clean-in-Place (CIP) Systems: Relationship between Contact Angle and Detergency. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 150527103417002. doi:10.1080/01932691.2014.1003223
- Karlsson, C.A.-C., Wahlgren, M.C., Christian Trägårdh, A. (1998). Some Surface-related Aspects of the Cleaning of New and Reused Stainless-steel Surfaces Fouled by Protein. *International Dairy Journal*, 8(10-11), 925–933. doi:10.1016/S0958-6946(99)00009-6
- Khanmohammadi, M., Rudmianeh, H.R., Garmarudi, A.B., Ghasemi, K. (2014). Evaluating the Performance of Detergent Powder Formulations Containing Nano Alumina Using Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18(2), 251–258. doi:10.1007/s11743-014-1646-6
- Kiermeier, F. y Wildbrett, G. (2000). Principios básicos de la limpieza. En: Wildbrett, G. (Ed.) *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Kiermeier, F., Wildbrett, G., y Mrozek, H. (2000). Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. En: Wildbrett, G. (Ed.) *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Kim, Y. J., Robinson, R.J. (1979). Effect of Surfactants on Starch in a Model System. *Starch - Stärke*, 31(9), 293–300. doi:10.1002/star.19790310904
- Kim, C., Hung, Y.-C., Brackett, R.E., Frank, J.F. (2001). Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms by electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25(2), 91–100. doi:10.1111/j.1745-4549.2001.tb00446.x
- Kim, C., Hung, Y.-C., Brackett, R.E., Lin, C.-S.(2003). Efficacy of Electrolyzed Oxidizing Water in Inactivating *Salmonella* on Alfalfa Seeds and Sprouts.*Journal of Food Protection*, 66(2), 208-214.
- Kosswig, K. (2011). Surfactants.En: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.Wiley-VCH, Vol. 35, 431-505.
- Kumar, S., Aswal, V.K., Kohlbrecher, J. (2012).Size-dependent interaction of silica nanoparticles with different surfactants in aqueous solution.*Langmuir*, 28(25), 9288-9297.doi: 10.1021/la3019056
- Kyoung-Nam, K. (2004). Patente WO2004104153 A1.*Manufacturing method of liquid laundry detergent with nano-sized silver colloid*.Solicitante: Neb Technologies, Reino Unido.
- Lai, L.N., Karim, A.A., Norziah, M.H., Seow, C.C. (2004). Effects of Na₂CO₃ and NaOH on Pasting Properties of Selected Native Cereal Starches.*Journal of Food Science*, 69(4), FCT249–FCT256. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb06324.x
- Lampitt, L.H., Fuller, C.H.F., Goldenberg, N. (1947). Starches and starch fractions. Part II: the determination of starch by hydrolysis with hydrochloric acid. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 66(4), 117-121.doi: 10.1002/jctb.5000660403
- Lazić, Z. (2004). Design of Experiments in Chemical Engineering. A practical guide. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Leclercq-Perlat, M-N. (2002). Modelización. En: Leveau, J.Y., y Bouix, M. (Eds.) *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. 1ª ed. Madrid, Mundi-Prensa.

- Leclercq-Perlat, M.-N., Lalande, M. (1994). Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *Journal of Food Engineering*, 23(4), 501–517. doi:10.1016/0260-8774(94)90108-2
- Leclercq-Perlat, M.-N., Tissier, J.-P., Benezech, T. (1994). Cleanability of stainless steel in relation to chemical modifications due to industrial cleaning procedures used in the dairy industry. *Journal of Food Engineering*, 23(4), 449–465. doi:10.1016/0260-8774(94)90104-X
- Lee, W.P., Martinez, A., Xu, D., Brooker, A., York, D.W., Ding, Y. (2009a). Effects of laponite and silica nanoparticles on the cleaning performance of amylase towards starch soils. *Particuology*, 7(6), 459–465. doi:10.1016/j.partic.2009.09.001
- Lee, J.H., Han, J.-A., Lim, S.-T. (2009b). Effect of pH on aqueous structure of maize starches analyzed by HPSEC-MALLS-RI system. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1935–1939. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.12.007
- Leidreiter, H.I., Gruning, B., Kaseborn, D. (1997). Amphoteric surfactants: processing, product composition and properties. *International Journal of Cosmetic Science*, 19(5), 239–253. doi:10.1111/j.1467-2494.1997.tb00187.x
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421–31. doi:10.1080/08927011003699535
- Li, L., Xu, H.H., Zhao, X.H., Han, J.C., Li, T.J. (2011). Conformation and stability of three different enzymes adsorbed onto SiO₂ nanoparticles. In *2011 International Conference on New Technology of Agricultural* (pp. 925–930). IEEE. doi:10.1109/ICAE.2011.5943940
- Liu, W., Zhang, Z., Fryer, P.J. (2006a). Identification and modelling of different removal modes in the cleaning of a model food deposit. *Chemical Engineering Science*, 61(22), 7528–7534. doi:10.1016/j.ces.2006.08.045

- Liu, W., Fryer, P.J., Zhang, Z., Zhao, Q., Liu, Y. (2006b). Identification of cohesive and adhesive effects in the cleaning of food fouling deposits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(4), 263–269. doi:10.1016/j.ifset.2006.02.006
- Lugo, D., Oberdisse, J., Karg, M., Schweins, R., Findenegg, G.H. (2009). Surface aggregate structure of nonionic surfactants on silica nanoparticles. *Soft Matter*, 5(15), 2928. doi:10.1039/b903024g
- Lundqvist, H., Eliasson, A.C., Olofsson, G. (2002a). Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part I. Surface tension measurements. *Carbohydrate Polymers*, 49(1), 43–55. doi:10.1016/S0144-8617(01)00299-5
- Lundqvist, H., Eliasson, A.C., Olofsson, G. (2002b). Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part II. Calorimetric study. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 109–120. doi:10.1016/S0144-8617(01)00326-5
- Lundqvist, H., Nilsson, G.S., Eliasson, A.C., Gorton, L. (2002c). Changing the Amylopectin-Sodium Dodecyl Sulphate Interaction by Modifying the Exterior Chain Length. *Starch - Stärke*, 54(3-4), 100–107. doi:10.1002/1521-379X(200204)54:3/4<100::AID-STAR100>3.0.CO;2-Y
- Martínez, M., Oliveros, R., Aracil, J. (2011). Synthesis of biosurfactants: enzymatic esterification of diglycerol and oleic acid. 1. Kinetic modeling. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(11), 6609–6614. doi: 10.1021/ie102560b
- Martínez-Gallegos, J. F. (2005). *Utilización de α -amilasas en la formulación de detergentes industriales*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Martínez, M., Oliveros, R., Aracil, J. (2011). Synthesis of biosurfactants: enzymatic esterification of diglycerol and oleic acid. 1. Kinetic modeling. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(11), 6609–6614. doi: 10.1021/ie102560b

- Martínez-Gallegos, J.F., Bravo-Rodríguez, V., Jurado-Alameda, E., García-López, A.I. (2011). Polyoxyethylene alkyl and nonyl phenol ethers complexation with potato starch. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1563–1571. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.01.010
- Matsson, M.K., Kronberg, B., Claesson, P.M. (2004). Adsorption of alkyl polyglucosides on the solid/water interface: equilibrium effects of alkyl chain length and head group polymerization. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 20(10), 4051–8. doi: 10.1021/la035959p
- Meine, G., Eutebach, A., Sonnenschein, F., Bunn, R., Gabriel, S. *et al.* (2014). Patente US8815786 B2. *Detergents or cleaning agents containing reaction products of odorants with metal oxides*. Solicitante: Henkel KGaA (Alemania).
- Mezzanotte, V., Bolzacchini, E., Orlandi, M., Rozzi, A., Rullo, S. (2002). Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates. *Bioresource Technology*, 82(2), 151–156. doi:10.1016/S0960-8524(01)00170-5
- Miller, C.A., Raney, K.H. (1993). Solubilization-emulsification mechanisms of detergency. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 74(2-3), 169–215. doi:10.1016/0927-7757(93)80263-E
- Mirajkar, Y.-R. (2009). Applications of surfactants in shampoos. En: Zoller, U. (Ed.) *Handbook of Detergents. Part E: Applications*. Surfactant Science Series, 141. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- Mitidieri, S., Souza, A.H., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97(10), 1217–24. doi:10.1016/j.biortech.2005.05.022
- Moerman, F., Rizoulières, P., Majoor, F.A. (2014). Cleaning in place (CIP) in food processing. En: Moerman, F., Leuven, K.U. (Eds.) *Hygiene in Food Processing: Principles and Practices*. Woodhead Publishing Limited. 305-383. doi:10.1533/9780857098634.3.305

- Montgomery, D.C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. Ed. Limusa Wiley. 2^a ed.
- Montserret, R., McLeish, M.J., Böckmann, A., Geourjon, C., Penin, F. (2000). Involvement of Electrostatic Interactions in the Mechanism of Peptide Folding Induced by Sodium Dodecyl Sulfate Binding. *Biochemistry*, 39(29), 8362–8373. doi:10.1021/bi000208x
- Mukherjee, A.K., Kumar, T.S., Rai, S.K., Roy, J.K. (2011). Statistical optimization of *Bacillus alcalophilus* α -amylase immobilization on iron-oxide magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6), 984–992. doi:10.1007/s12257-009-3160-7
- Napper, D., Netschey, A. (1971). Studies of the steric stabilization of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 37(3), 528–535. doi:10.1016/0021-9797(71)90330-4
- Naganuma, M., Nakasuzi, M., Ono, Y., Seo, M. (1973). Patente GB1308433 A. *Method for cleaning metal surface*. Solicitante: Toyo Ink Manufacturing Ltd., Japón.
- Netto, C.G.C.M., Toma, H.E., Andrade, L.H. (2013). Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85-86, 71–92. doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.010
- NIST/SEMATECH (2012). *NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods*. Web: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>. Marzo 2016.
- Nor Nadiha, M.Z., Fazilah, A., Bhat, R., Karim, A. (2010). Comparative susceptibilities of sago, potato and corn starches to alkali treatment. *Food Chemistry*, 121(4), 1053–1059. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.048
- Olsen, H.S., Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1(4), 555–567. doi:10.1007/s11743-998-0058-7

- Orlich, B., Richter, B., Plantenberg, T. (2007). Patente US20070256251 A1. *Washing and cleaning products comprising immobilized active ingredients*. Solicitante: Henkel KGaA, Alemania.
- Otto, C., Zahn, S., Plenker, J., Rohm, H. (2014). Application of a flow cell for the comparative investigation of the cleaning behavior of starch and protein. *Journal of Food Engineering*, 131, 1–6. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.01.008
- Pérez, S., Baldwin, P.M., Gallant, D.J. (2009). Structural features of starch granules I. En: BeMiller, J.M. y Whistler, R.L. (Eds). *Starch: Chemistry and Technology*. Academic Press, pp. 149-192.
- Pérez-Prat, E.M., Gonzales, D.A., Asmanidou, A., Fernández, S. (2013). Patente US8546316 B2. *Liquid detergent composition with natural abrasive particles*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.
- Pettee, S., Peters, M., Faulder, D. (2011). Patente US20110048967 A1. *Compositions and methods for electrolytic cleaning of a material*. Solicitante: Woody America LLC (EEUU).
- Pitombeira, G.I., Cohrs, C. (2014). Patente US20140261561 A1. *Automatic dishwashing detergent compositions comprising ethercarboxylic acids or their salts, which are free of nonionic surfactants*. Solicitante: Clariant International Ltd., Alemania.
- Plasman, V., Caulier, T., Boulos, N. (2005). Polyglycerol esters demonstrate superior antifogging properties for films. *Plastics, Additives and Compounding*, 7(2), 30–33. doi:10.1016/S1464-391X(05)00359-4
- Pongsawasdi, P., Murakami, S. (2010). Carbohydrases in detergents. En: Hagen, E.T. (Ed.) *Detergents: Types, Components and Uses*. Biochemistry Research Trends Series, Nova Science Publishers, pp. 71-95.
- Price, K.N., Scheper, W.M., Tremblay, M.E., Drzewiecki, P.J. (2003). Patente US20030213503 A1. *Signal-based electrochemical methods for automatic dishwashing*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.

- Qin, Y., Zhang, G., Zhang, J., Zhao, Y., Zhao, J. (2006). Primary aerobic biodegradation of linear and oxo alcohol alkylpolyglucosides (APG). *Journal of Surfactants and Detergents*, 9(3), 227–230. doi:10.1007/s11743-006-5001-4
- Radhika, G.S., Moorthy, S.N. (2008). Effect of Sodium Dodecyl Sulphate on the Physicochemical, Thermal and Pasting Properties of Cassava Starch. *Starch - Stärke*, 60(2), 87–96. doi:10.1002/star.200700667
- Ríos, F. (2014). *Comportamiento ambiental de tensioactivos comerciales: biodegradabilidad, toxicidad y ozonización*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Rizoulières, P., Cluzet, A., Cecceladi, B., Remond, B., Martin, D., Coelho, G. *et al.* (2009). Design of Cleaning-in-place stations in the agro-food industry. *EHEDG France Technical Recommendation – RT01*, 1^a ed., Laval, France.
- Roy, J.K., Rai, S.K., Mukherjee, A.K. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 219–29. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.10.026
- Roy, J.K., Mukherjee, A.K. (2013). Applications of a high maltose forming, thermostable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 220–230. doi:10.1016/j.bej.2013.06.012
- Russell, G.L., Britton, L.N. (2002). Use of certain alcohol ethoxylates to maintain protease stability in the presence of anionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(1), 5–10. doi:10.1007/s11743-002-0198-9
- Saefkow, M., Czech, M., Philipps, A. (2010). Patente WO2010115985 A1. *Device for treating foods*. Solicitante: Simply Water GmbH, Alemania.
- Sanderson, H., Dyer, S.D., Price, B.B., Nielsen, A.M., van Compernelle, R., Selby, M., *et al.* (2006). Occurrence and weight-of-evidence risk assessment of alkyl sulfates, alkyl ethoxysulfates, and linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in river water and sediments. *The Science of the Total Environment*, 368(2-3), 695–712. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.04.030

- Scheper, W.M., Price, K.N., Tremblay, M.E., Drzewiecki, P.J. (2010). Patente US7816314 B2. *Automatic dishwashing compositions and methods for use with electrochemical cells and/or electrolytic devices*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.
- Schmidt, R.H. (1997). *Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.
- Schöler, M., Fuchs, T., Helbig, M., Augustin, W., Scholl, S., Majschak, J.-P. (2009). Monitoring of the local cleaning efficiency of pulsed flow cleaning procedures. *Proceedings of International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning VII*, 455-463.
- Schöler, M., Föste, H., Helbig, M., Gottwald, A., Friedrichs, J., Werner, C. et al. (2012). Local analysis of cleaning mechanisms in CIP processes. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 858–866. doi:10.1016/j.fbp.2012.06.005
- Schwartz, A. M. (1971). Recent advances in detergency theory. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(10), 566–570. doi:10.1007/BF02544564
- Schweiker, G.C. (1981). Detergent builders. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 58(2), 170-173.
- Schwuger, M. J. (1982). Effects of adsorption on detergency phenomena: I. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 59(6), 258–264. doi:10.1007/BF02546350
- Scott, M.J., Jones, M.N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508(1-2), 235–251. doi:10.1016/S0304-4157(00)00013-7
- Shafiei, M., Ziaee, A.-A., Amoozegar, M.A. (2011). Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(2), 275–81. doi:10.1007/s10295-010-0770-1

- Sharma, M.M., Chamoun, H., Sarma, D.S.H.S.R., Schechter, R.S. (1992). Factors controlling the hydrodynamic detachment of particles from surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 149(1), 121–134. doi:10.1016/0021-9797(92)90398-6
- Shimizu, Y., Hurusawa, T. (1992). Antiviral, antibacterial, and antifungal actions of electrolyzed oxidizing water through electrolysis. *Dental Journal*, 37, 1055-1062.
- Sibila, M.A. (2008). *Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Sigma (1997). *Enzymatic Assay of α -amylase (EC 3.2.1.1)*. Sigma Quality Control Test Procedure A0521. Última consulta 24/03/2016. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/a0521enz.pdf
- Simmons, M.J.H., Jayaraman, P., Fryer, P.J. (2007). The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 517–528. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.02.013
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N., Singh Gill, B. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81(2), 219–231. doi:10.1016/S0308-8146(02)00416-8
- Slaughter, S.L., Ellis, P.R., Butterworth, P.J. (2001). An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1525(1-2), 29–36. doi:10.1016/S0304-4165(00)00162-8
- Smulders, E., Sung, E. (2011). Laundry detergents, 2. Ingredients and products. En: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Vol. 20, 393-447.
- Soleimani, M., Khani, A., Najafzadeh, K. (2012). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1-2), 1–5. doi:10.1016/j.molcatb.2011.07.011

- Soleimani, M., Khani, A., Dalali, N., Behbehani, G.R. (2013). Improvement in the Cleaning Performance Towards Protein Soils in Laundry Detergents by Protease Immobilization on the Silica Nanoparticles. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(3), 421–426. doi:10.1007/s11743-012-1397-1
- Sommerville, N.P. (2010). Patente US7858573 B2. *Process for making a detergent composition containing a sulfonic acid/carboxylic acid copolymer and a hydrophobic silica*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.
- Sommerville, N.P. (2013). Patente CA 2696324C. *Process for making a detergent composition*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.
- Souza, R.C.R., Andrade, C.T. (2002). Investigation of the gelatinization and extrusion processes of corn starch. *Advances in Polymer Technology* 21(1), 17-24. doi: 10.1002/adv.10007
- Sowle, E.D., Bowling, D.C. (1988). Patente US5834414A. *Detergent composition having improved chlorine stability characteristics, novel chlorine containing format and method of making chlorine stable composition*. Solicitante: Ecolab Inc., EEUU.
- Suárez, L., Díez, M.A., García, R., Riera, F.A. (2012). Membrane technology for the recovery of detergent compounds: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(6), 1859–1873. doi:10.1016/j.jiec.2012.05.015
- St. Laurent, J.B., Buzzaccarini, F.D., de Clerk, K., Demeyere, H., Labeque, R., Lodewick, R., et al. (2007). Laundry cleaning of textiles. En: Schmidt, R.H. (1997). *Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.
- Stiller, S., Gers-Barlag, H., Lergenmueller, M., Pflücker, F., Schulz, J., Wittern, K.P., et al. (2004). Investigation of the stability in emulsions stabilized with different surface modified titanium dioxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232(2-3), 261–267. doi:10.1016/j.colsurfa.2003.11.003

- Svensson, E., Gudmundsson, M., Eliasson, A.-C. (1996). Binding of sodium dodecylsulphate to starch polysaccharides quantified by surface tension measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 6(4-5), 227–233. doi:10.1016/0927-7765(95)01260-5
- Sørensen, S.P.L. (1909). Enzyme Studies.II. The Measurement and Importance of the Hydrogen Ion Concentration in Enzyme Reactions. *Biochemische Zeitschrift*, 21, 131-304.
- Tadros, T.F. (2005). *Applied surfactants.Principles and applications*.1^a ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Tanaka, A., Hoshino, E. (1999). Study on the substrate specificity of α -amylases that contribute to soil removal in detergents. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2(2), 193–199. doi:10.1007/s11743-999-0073-8
- Tanaka, A., Hoshino, E. (2002). Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with Bacillus α -amylases in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(5), 485–490. doi:10.1016/S1389-1723(02)80096-2
- Tatsumi, T., Zhang, W., Nakatsuji, Y., Miyake, K., Matsushima, K., Tanaka, M. *et al.* (2001). Preparation, surface-active properties, and antimicrobial activities of bis(alkylammonium) dichlorides having a butenylene or a butynylene spacer. *Journal of Surfactants and Detergents*, 4(3), 271–277. doi:10.1007/s11743-001-0179-z
- Tester, R.F., Morrison, W.R. (1990).Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chemistry*, 67(6), 551-557.
- Timperley, D.A., Smeulders, C.N.M. (1988). Cleaning of dairy HTST plate heat exchangers: optimization of the single-stage procedure. *International Journal of Dairy Technology*, 41(1), 4–7. doi:10.1111/j.1471-0307.1988.tb00572.x
- Uppgard, L., Sjöström, M., Wold, S. (2000).Multivariate quantitative structure-activity relationships for the aquatic toxicity of alkyl polyglucosides.*Tenside, Surfactants, Detergents*, 37(2), 131–138.

- van der Maarel, M.J.E., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155. doi:10.1016/S0168-1656(01)00407-2
- Varzakas, T. (2015). *Centrifugation-filtration*. En: Varzakas, T. y Tzia, C. (Eds.) *Food Engineering Handbook*. Contemporary Food Engineering Series, CRC Press, pp. 61-131.
- Verran, J., Rowe, D., Cole, D., Boyd, R. (2000). The use of the atomic force microscope to visualise and measure wear of food contact surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(2), 99–105. doi:10.1016/S0964-8305(00)00070-6
- Vicaria, J.M., Jurado, E., Herrera-Márquez, O. (2014). Patente ES2518790 A1. *Procedimiento y dispositivo de limpieza de superficies metálicas utilizando una corriente continua*. Solicitante: Universidad de Granada.
- Vincent, J. (2002). La química de la limpieza. En: Leveau, J.Y., y Bouix, M. (Eds.) *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. 1ª ed. Madrid, Mundi-Prensa.
- von Rybinski, W. (2007). Physical aspects of cleaning processes. En: Johansson, I. y Somasundaran, P. (Eds.) *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*. Elsevier, B.V., 1-56.
- von Rybinski, W., Hill, K. (1998). Alkyl Polyglycosides-Properties and Applications of a new Class of Surfactants. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(10), 1328–1345. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980605)37:10<1328::AID-ANIE1328>3.0.CO;2-9
- Waldhoff, H., Spilker, R. (Eds.) (2016). *Handbook of Detergents, Part C: Analysis* (Vol. 123). CRC Press.
- Walker, S.P., Demirci, A., Graves, R.E., Spencer, S.B., Roberts, R.F. (2005a). Cleaning milking systems using electrolyzed oxidizing water. *Transactions of the ASAE*, 48(5), 1827-1833.

- Walker, S.P., Demirci, A., Graves, R.E., Spencer, S.B., Roberts, R. F. (2005b). Response surface modelling for cleaning and disinfecting materials used in milking systems with electrolysed oxidizing water. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2), 65–73. doi:10.1111/j.1471-0307.2005.00190.x
- Wang, S., Copeland, L. (2012). Effect of alkali treatment on structure and function of pea starch granules. *Food Chemistry*, 135(3), 1635–42. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.003
- Wangsakan, A., Chinachoti, P., McClements, D.J. (2004). Effect of Surfactant Type on Surfactant–Maltodextrin Interactions: Isothermal Titration Calorimetry, Surface Tensiometry, and Ultrasonic Velocimetry Study. *Langmuir*, 20(10), 3913–3919. doi:10.1021/la0361619
- Ware, A.M., Waghmare, J.T., Momin, S.A. (2007). Alkylpolyglycoside: Carbohydrate Based Surfactant. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(3), 437–444. doi:10.1080/01932690601107807
- Wasan, D.T., Nikolov, A.D. (2003). Spreading of nanofluids on solids. *Nature*, 423(6936), 156–9. doi:10.1038/nature01591
- Wasan, D.T., Nikolov, A.D., McDonald, M.R., Hecht, S.E. (2010). Patente US20100234263 A1. *Nano-fluids as cleaning compositions for cleaning solid surfaces, a method for formulation and use*. Solicitante: Procter & Gamble, EEUU.
- Wildbrett, G. (2000). Factores determinantes de la eficacia en las operaciones de limpieza. En: Wildbrett, G. (Ed.) *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, 347 p.
- Wildbrett, G., Sauerer, V. (1989). Cleanability of PMMA and PP compared with stainless steel. En: Kessler, H. y Lund, D. (Eds.), *Fouling and Cleaning in Food Processing. Proceedings ICFE*, 163-177.
- Wolfgang, A. (2004). *Enzymes in Industry: Production and Applications* (2ª ed.). Weinheim: Wiley-VCH.

- Yan, S., Li, A., Zheng, H., Luo, M., Xing, X. (2009). Effects of Ionic Surfactants on Bacterial Luciferase and α -Amylase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(5), 829-834. doi:10.1016/S1004-9541(08)60283-9
- Ying, G.-G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3), 417-31. doi:10.1016/j.envint.2005.07.004
- Yiu, P.H., Loh, S.L., Rajan, A., Wong, S.C., Bong, C.F.J. (2008). Physicochemical properties of sago starch modified by acid treatment in alcohol. *American Journal of Applied Sciences* 5(4), 307-311.
- Yu, Y., Zhao, J., Bayly, A.E. (2008). Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(4), 517-527. doi:10.1016/S1004-9541(08)60115-9
- Zaki, N. (2007). Electrocleaning. *Metal Finishing*, 105(10), 98-103. doi:10.1016/S0026-0576(07)80323-0
- Zhang, R., Somasundaran, P. (2006). Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 213-29. doi:10.1016/j.cis.2006.07.004
- Zhang, L.-M., Zhou, Y.-J., Wang, Y. (2006). Novel hydrogel composite for the removal of water-soluble cationic dye. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(5), 799-804. doi:10.1002/jctb.1536
- Zhang, J., Zhang, Y., Li, W., Li, X., Lian, X. (2014). Optimizing Detergent Formulation with Enzymes. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(6), 1059-1067. doi:10.1007/s11743-014-1626-x

Nomenclatura



A	Actividad enzimática (U)
ANOVA	Análisis de la varianza
AR	Actividad relativa (%)
AR _m	Actividad relativa media (%)
A _T	Actividad enzimática en presencia de tensioactivos (U)
Abs	Absorbancia
Abs ₄₉₀	Absorbancia a 490 nm
Abs ₄₉₀	Absorbancia a 490 nm a tiempo inicial del ensayo de lavado
AE	Alcohol etoxilado
APG	Alquilpoliglucósido
A200	Nanopartículas de sílice Aerosil® 200
A380	Nanopartículas de sílice Aerosil® 380
BSF	Dispositivo Baño-Sustrato-Flujo
C _{AE}	Concentración de AE en el sobrenadante de suspensiones de partículas (mg/L)
C _{almidón}	Concentración de almidón en la solución de lavado a tiempo t (mg/L)
C _{almidónmax}	Concentración máxima de almidón en la solución de lavado (mg/L)
C _{APG}	Concentración de APG en el sobrenadante de suspensiones de partículas (mg/L)
C _{A200}	Concentración de A200 en el ensayo de interacción entre tensioactivos y partículas (g/L)
C _{A380}	Concentración de A380 en el ensayo de interacción entre tensioactivos y partículas (g/L)
CC	Corriente continua
C _e	Concentración de enzima en el ensayo de actividad de la enzima α-amilasa (mg/L)
CE	Concentración de enzima en los ensayos de lavado (g/L)
CIP	Sistema de limpieza “Cleaning in place”
C _m	Concentración de maltosa (mg/L)
CMC	Concentración micelar crítica (g/L)

CMP	Concentración de partículas S50 (g/L)
C_{MP5}	Concentración de MP5 en el ensayo de interacción entre tensioactivos y partículas (g/L)
C_{NP50}	Concentración de NP50 en el ensayo de interacción entre tensioactivos y partículas (g/L)
C_{S50}	Concentración de S50 en el ensayo de interacción entre tensioactivos y partículas (g/L)
CT	Concentración de tensioactivo (g/L)
Da	Unidad de masa atómica (también nombrada como u)
De	Detergencia (%)
De_f	Detergencia a tiempo final del ensayo (%)
$De_{peso45min}$	Detergencia a tiempo final del ensayo calculada por diferencia de pesada (%)
De_t	Detergencia a un tiempo t (%)
DID	Detergent Ingredients Database
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
DP	Grado de polimerización
D1	Diseño de experimentos que modeliza la detergencia de suspensiones de S50 en solución a pH constante
D2	Diseño de experimentos que modeliza la detergencia de suspensiones de S50 en solución de AE 1.0 g/L a pH constante
D3	Diseño de experimentos que modeliza la detergencia de suspensiones de S50 en solución de APG 1.0 g/L a pH constante
ECA	Tensioactivo derivado de ácidos alquil éter carboxílicos
ECA-OE3	Derivado de ácido alquil éter carboxílico con un promedio de 2.5 unidades de óxido de etileno
ECA-OE10	Derivado de ácido alquil éter carboxílico con un promedio de 10 unidades de óxido de etileno
EOW	Agua electrolizada oxidante
ERW	Agua electrolizada reductora
EW	Agua electrolizada

FD	Factor de dilución
G.L.	Grados de libertad
HLB	Balance hidrófilo-lipófilo
LAS	Lineal alquilbenceno sulfonato
$m_{\text{almidón}}$	Masa de almidón adherida al sustrato al inicio del ensayo de lavado (g)
$m_{\text{baño}}$	Masa de almidón en el baño de lavado del dispositivo BSF (g)
MP	Micropartícula
MP5	Micropartículas de magnetita de diámetro inferior a 5 μ m
$m_{\text{sustratolavado}}$	Masa del sustrato una vez finalizado el ensayo y secado en estufa (g)
m_{sustrato}	Masa del sustrato sin ensuciar (g)
$m_{\text{sustratosucio}}$	Masa del sustrato sucio al inicio del ensayo de lavado (g)
NP	Nanopartícula
NP50	Nanopartículas de magnetita de diámetro menor a 50 nm
PGE	Éster de glicerina polietoxilado
PGE-OE2	Éster de glicerina polietoxilado con un promedio de 2 unidades de óxido de etileno
PGE-OE17	Éster de glicerina polietoxilado con un promedio de 17 unidades de óxido de etileno
p-valor	Umbral de rechazo de la hipótesis nula en un test estadístico
Q	Caudal (L/h)
Q ²	Porcentaje de la variación de la respuesta predicha por el modelo
R ²	Coefficiente de determinación, porcentaje de la variación de la respuesta explicada por el modelo
Razón-F	Cociente entre los cuadrados medios entre grupos e intra grupos en el ANOVA
Re	Número de Reynolds
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
S50	Micropartículas de sílice Sipernat® 50

T	Temperatura (°C)
t	Tiempo (min)
t_{lavado}	Tiempo de lavado con corriente continua en los ensayos de electrolimpieza con periodo de mojado previo (min)
U	Unidad de actividad de la enzima α -amilasa (μmol maltosa)/(mg enzima.min)
W_{ad}	Trabajo de adsorción de una partícula sólida a un sustrato
X	Factores en el Diseño de Experimentos
Y	Variables respuesta en el Diseño de Experimentos
β_{CMP}	Término de primer orden del modelo empírico de ajuste que relaciona la respuesta con el factor CMP
$\beta_{\text{CMP,pH}}$	Término de interacción entre los factores CMP y pH del modelo empírico de ajuste
$\beta_{\text{CMP,Q}}$	Término de interacción entre los factores CMP y Q del modelo empírico de ajuste
β_0	Término independiente del modelo empírico de ajuste
β_i	Término de primer orden del modelo empírico de ajuste que relaciona la respuesta con el factor i
β_{ij}	Término de interacción entre los factores i y j del modelo empírico de ajuste
β_{pH}	Término de primer orden del modelo empírico de ajuste que relaciona la respuesta con el factor pH
β_{pH^2}	Término cuadrático del modelo empírico de ajuste que relaciona la respuesta con el factor pH
$\beta_{\text{pH,Q}}$	Término de interacción entre los factores pH y Q del modelo empírico de ajuste
β_Q	Término de primer orden del modelo empírico de ajuste que relaciona la respuesta con el factor Q
ε	Error del modelo empírico de ajuste
σ^2	Varianza de una distribución normal
$\%_{\text{RES}}$	Porcentaje de tensioactivo residual en el sobrenadante de suspensiones de partículas

