

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

Evaluación de la efectividad de un detergente biodegradable para un  
sistema de limpieza cerrado (CIP) en la industria alimentaria

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero de Alimentos**

Presentado por:

Julissa Pamela Cruz Vera

Jhonathan Wellington Ramírez García

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

Año: 2019

## **DEDICATORIA**

Este presente proyecto se lo dedico a Dios, que me ha dado salud, fuerza, perseverancia en esta lucha constante de alcanzar mis objetivos.

A mis padres, por haberme inculcado valores para poder ser la persona que hoy en día soy, y por su amor, esfuerzo, dedicación que han tenido conmigo me han permitido cumplir con esta etapa de mi educación.

A mis hermanos, quienes fueron el ejemplo a seguir, por haberme brindado su apoyo, consejos y ánimo.

Agradezco a todas las personas, amigos que aportaron con su ayuda durante mi proceso de formación.

### **Julissa Pamela Cruz Vera**

Este proyecto se lo dedico a Dios y a mis padres, porque ellos han sido siempre mis pilares fundamentales en toda mi vida como estudiante.

### **Jhonathan Wellington Ramírez García**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por haberme brindado la oportunidad de terminar mi carrera universitaria, a mis padres que con su infinito amor me dieron la valentía necesaria para que pueda lograr mis metas. Además, tengo la gran satisfacción de haber adquirido conocimientos de profesionales que enriquecieron mi vida con su intelecto, especialmente le agradezco a la M.Sc. Diana Coello Montoya gracias con su guía y preparación me instruyó de una manera eficaz durante el desarrollo del proyecto.

### **Julissa Pamela Cruz Vera**

Gratitud a Dios por darme la vida, cuidarme en cada decisión que tomé y ponerme personas en el camino que van moldeando la persona que soy ahora. A mis padres por su esfuerzo y alentarme a seguir cada vez más adelante, a repetirme cada vez que un resbalón no es caída. A mi hermano, por ser una guía de cómo debe madurar una persona. A la M.Sc. Diana Coello por la ayuda y la guía que me brindó en el transcurso de este proyecto, por enseñarme que la dedicación es lo más importante.

### **Jhonathan Wellington Ramírez García**

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Julissa Pamela Cruz Vera* y *Jhonathan Wellington Ramírez García* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Julissa Pamela Cruz Vera



Jhonathan Wellington Ramírez García

## EVALUADORES



**M.Sc. Haydee Torres Camba**

PROFESOR DE LA MATERIA



**M.Sc. Diana Coello Montoya**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

Las industrias de alimentos emplean agentes de limpieza para mantener un área de trabajo inocua. Sin embargo, los residuos líquidos provenientes de estas limpiezas causan problemas de eutrofización por el uso de detergentes alcalinos que suelen estar compuesto de soda cáustica. Por esta razón, este trabajo tiene como objetivo evaluar un detergente biodegradable para sistemas de limpieza CIP, sustituyendo porcentualmente la soda cáustica por un tensioactivo microbiano (surfactina).

Para la experimentación se partió de una fórmula base alcalina donde se obtuvieron 6 fórmulas variando la concentración de soda líquida al 50% y la del biotensioactivo. Para seleccionar la mejor fórmula se realizaron pruebas de prevención de la adherencia para *Bacillus cereus* ATTC 10876 y *Escherichia coli* ATTC 11775 en placas de acero inoxidable 316. Luego con la fórmula seleccionada, se realizaron pruebas de eliminación de la adherencia para las mismas bacterias, comparando los resultados con la fórmula base. Finalmente, para comprobar la efectividad se realizó dos procesos de limpieza CIP, uno con la fórmula base y otro con la fórmula seleccionada, luego de evaporar leche en un evaporador de películas ascendente.

La fórmula del detergente biodegradable escogida fue aquella que tuvo la concentración más alta de biotensioactivo y la más baja de soda cáustica, mostrando un 99.68% en la prevención de la adherencia de *Bacillus cereus*, y un 99.99% y 99.90% en la eliminación de la adherencia de *B. cereus* y *E. coli*, respectivamente, cuyos valores fueron similares para la fórmula base. En el proceso de limpieza CIP se comprobó su eficiencia al reducir en mayor porcentaje el número de mesófilos aerobios (96.65%), en comparación con la fórmula base que llegó a reducir 76.89%.

**Palabras claves:** Biotensioactivo, detergente, soda cáustica, biopelículas, prevención.

## **ABSTRACT**

*The food industries employ cleaning agents to maintain a safe work area. However, liquid waste from these cleanings causes eutrophication problems due to the use of alkaline detergents that are usually made up of caustic soda. For this reason, this work aims to evaluate a biodegradable detergent for CIP cleaning systems, replacing caustic soda with a microbial surfactant (surfactin).*

*For the experimentation, 6 formulas were obtained by varying the concentration of caustic soda and the biosurfactant based on an alkaline base formula. To select the best formula, adhesion prevention tests were performed for *Bacillus cereus* ATTC 10876 and *Escherichia coli* ATTC 11775 on 316 stainless steel plates. Then with the chosen formula, adhesion removal test was performed for both bacteria, comparing the results with the base formula. Finally, to verify the effectiveness, two CIP cleaning processes were carried out, one with the base formula and one with the selected formula, after evaporating milk in an ascending film evaporator.*

*The chosen biodegradable detergent formula had the highest concentration of biosurfactant and the lowest concentration of caustic soda, showing 99.68% in the adhesion prevention test of *Bacillus cereus*, and 99.99% and 99.90% in the adhesion removal test of *B. cereus* and *E. coli*, respectively, whose values were similar for the base formula. In the CIP cleaning process, its efficiency was proven by reducing a higher percentage of aerobic mesophilic bacteria (96.65%), compared to the base formula that reached 76.89% of reduction.*

**Keywords:** *Biosurfactant, detergent, caustic soda, biofilms, prevention.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS .....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Descripción del problema .....	2
1.2 Justificación del problema .....	2
1.3 Objetivos .....	2
1.3.1 Objetivo General .....	2
1.3.2 Objetivos específicos.....	2
1.4 Marco Teórico .....	3
1.4.1 Limpieza in Situ-CIP .....	3
1.4.2 Compuestos de limpieza alcalina .....	5
1.4.3 Biotensioactivos .....	6
CAPÍTULO 2.....	9
2. METODOLOGÍA.....	9
2.1 Formulación de detergentes .....	9
2.2 Parámetros fisicoquímico de detergentes alcalinos .....	11
2.2.1 Determinación de pH.....	11
2.2.2 Determinación de la densidad .....	12
2.3 Preparación de las superficies de ensayo .....	12



2.4 Prevención de la adherencia de microorganismos .....	12
2.4.1 Diseño de experimentos .....	14
2.5 Eliminación de la adherencia de microorganismo .....	14
2.6 Método de hisopado y recuento microbiano .....	15
2.7 Calculo de reducción de la carga microbiana .....	16
2.8 Operación de limpieza CIP en evaporador de película ascendente .....	16
2.9 Análisis económico.....	18
CAPÍTULO 3.....	19
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	19
3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos .....	19
3.2 Prevención de la adherencia de microorganismos .....	20
3.3 Eliminación de la adherencia de microorganismos del detergente biodegradable seleccionado y detergente base.....	22
3.4 Verificación microbiológica de limpieza CIP en evaporador de película ascendente.....	24
3.5 Costos .....	25
CAPÍTULO 4.....	28
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	28
4.1 Conclusiones.....	28
4.2 Recomendaciones.....	29
BIBLIOGRAFÍA	
APÉNDICES	

## ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FIMCP	Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción
CIP	Cleaning In Place
PAA	Ácido Peracético
EPM	Matriz Polimérica Extracelular
CMC	Concentración Micelar Crítica
MHB	Mueller Hilton Broth
PCA	Plate Count Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
PVP	Precio de Venta al Público
UTA	Universidad Técnica de Ambato
TSM	Tensioactivo microbiano
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
FDA	Food and Drug Administration
CFR	Code of Food Regulation
E.	<i>Escherichia</i>
B.	<i>Bacillus</i>
rpm	Revoluciones Por Minuto

## SIMBOLOGÍA

pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes Por Millón
°C	Grados Celsius
g	Gramo
mg	Miligramo
L	Litro
%	Porcentaje
ml	Mililitro
μl	Microlitro
cm <sup>2</sup>	Centímetro Cuadrado
cm <sup>3</sup>	Centímetro Cúbico
h	Hora
log	Logaritmo
p	Peso
v	Volumen
m	Masa
CIP FB	Cleaning In Place de la Fórmula base
CIP F1	Cleaning In Place de la Fórmula 1
Kwh	Kilovatio por hora
c.s.p.	Cantidad Suficiente Para
spp.	Especies
mN	Milinewton
min	Minutos
sol.	Solución
FB	Fórmula base
F1	Fórmula 1
F2	Fórmula 2
F3	Fórmula 3
F4	Fórmula 4
F5	Fórmula 5
F6	Fórmula 6
ρ	Densidad

Kg	kilogramos
NaCl	Cloruro de Sodio
$\Sigma C$	Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas
$V$	Volumen inoculado en cada caja Petri
$n_1$	Número de placas de la primera dilución seleccionada
$n_2$	Número de placas de la segunda dilución seleccionada
$d$	Factor de dilución de la primera dilución seleccionada
$N$	Número de microorganismos.
$N_0$	Recuento inicial obtenido en la prueba de viabilidad.
$N_t$	Recuento final obtenido luego de estar en contacto el microorganismo con el detergente durante un tiempo estimado del estudio.
E	Reducción de la carga microbiana.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la surfactina .....	8
Figura 2.1 Esquema de prevención de la adherencia de microorganismos .....	13
Figura 3.1 Evaporador de película ascendente alimentado con leche ubicado en el Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Alimentos de la FIMCP-ESPOL .....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Factores que influyen en un proceso de limpieza CIP .....	4
Tabla 1.2 Ventajas de biotensioactivo sobre sus homólogos químicos .....	7
Tabla 2.1 Formulaciones de detergentes alcalinos.....	11
Tabla 2.2 Factores, niveles y variables de respuesta de la experimentación.....	14
Tabla 2.3 Etapas del sistema de limpieza CIP convencional .....	17
Tabla 3.1 Valores de pH y densidad de las formulaciones .....	19
Tabla 3.2 Porcentajes de prevención de adherencia de microorganismos para las 6 fórmulas del detergente biodegradable al 2% .....	20
Tabla 3.3 Porcentajes de prevención de la adherencia de microorganismos con la fórmula F1 y la fórmula base FB al 5% .....	22
Tabla 3.4 Porcentaje de eliminación de la adherencia y reducción logarítmica de biopelículas de E. coli .....	23
Tabla 3.5 Porcentaje de eliminación de la adherencia y reducción logarítmica de biopelículas de B. cereus .....	23
Tabla 3.6 Resultados del conteo de aerobios mesófilos en UFC/ml de los procesos de limpieza del sistema CIP .....	25
Tabla 3.7 Punto de equilibrio para el detergente alcalino biodegradable .....	27

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

Las industrias de alimentos presentan un importante problema de proliferación de especies bacterianas patógenas y de deterioro, algunas de las cuales son capaces de formar biopelículas que les proveen de protección, impidiendo que los procesos de limpieza comunes actúen con efectividad y que éstas permanezcan en el medio ambiente post-sanidad, arriesgando la seguridad y la calidad de los alimentos (Navia, Villada & Mosquera, 2010). Debido a esto, las industrias requieren utilizar detergentes para sus procesos de limpieza, sin embargo, los detergentes tienen la particularidad de ocasionar un alto impacto ambiental al inducir problemas de eutrofización, debido a algunos de sus ingredientes como, por ejemplo, fósforos procedentes del tripolifosfato (Giovanni & Hugo, 2012).

Además, otro de los problemas que producen los detergentes es la formación de espuma en aguas superficiales, lagos, ríos y plantas depuradoras de aguas residuales, ya que estos tienen la capacidad de interferir en el proceso de mezcla del oxígeno atmosférico con el agua, disminuyendo el oxígeno disuelto, dificultando el proceso de floculación y la tensión superficial (Giovanni & Hugo, 2012). Algunas formulaciones de detergentes pueden llegar a ser tóxicas, produciendo efectos agudos o subletales, que se ven reflejadas en especie acuáticas, afectando su crecimiento, comportamiento o reproducción (Giovanni & Hugo, 2012).

Es por ello que las industrias fabricantes de químicos de limpieza se han visto en la necesidad del uso de ingredientes/materias primas más amigables con el medio ambiente para remediar el impacto ambiental del uso de químicos. La producción y el uso de tensioactivos microbianos obtenidos a partir de materias primas renovables y aplicados en la formulación de detergentes, cumplen muchos principios de la química verde y representan una herramienta importante para la innovación y la sostenibilidad, llamando así la atención en estos últimos años a la industria de químicos (Modor Intelligence, 2019).

## **1.1 Descripción del problema**

Los residuos líquidos provenientes de la limpieza de industrias de alimentos pueden causar cambios en las características de las aguas receptoras; si se tiene en cuenta la cantidad vertida y la frecuencia con la que se vierte, pueden provocar daños ambientales debido a las altas concentraciones de químicos acumulados en estas fuentes, desencadenando procesos de eutrofización.

Un tipo de estos productos químicos son los detergentes alcalinos, los cuales en su mayoría contienen hidróxido de sodio, lo cual les otorga características irritantes y corrosivas, convirtiéndolos en un peligro para los organismos acuáticos, debido también a que algunas industrias no llegan a cumplir los parámetros de control ambiental de las aguas que desechan a los cuerpos receptores.

## **1.2 Justificación del problema**

Para reducir el impacto ambiental ocasionado por los residuos líquidos del proceso de limpieza de la industria de alimentos, es importante desarrollar y evaluar un detergente alcalino compuesto por tensioactivos microbianos (surfactina) producido por *Bacillus subtilis*, que aporte al detergente baja toxicidad, menor agresividad con el medio ambiente, mayor efectividad en la reducción o inhibición de bacterias patógenas, y ayuda en la prevención y eliminación de biopelículas.

Entre los posibles beneficios para la industria de alimentos se cuenta con la reducción de costos de insumos de limpieza, y minimización del tiempo y energía requeridos en el sistema de limpieza CIP.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar la aplicación de tensioactivos microbianos (TSM) aislados de *Bacillus subtilis* para la formulación de detergentes biodegradables mediante su aplicación en sistemas de limpieza cerrados.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Formular detergentes biodegradables mediante el reemplazo de soda cáustica por tensioactivos microbianos.



- Establecer la efectividad de las formulaciones en superficie mediante el porcentaje de prevención de la adherencia de los microorganismos para la selección de la mejor fórmula.
- Determinar el efecto de la formulación seleccionada en sistemas de limpieza cerrados (CIP) utilizando como modelo un evaporador de película ascendente.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Limpieza in Situ-CIP**

En la industria alimentaria, si el proceso de limpieza y desinfección no se lleva a cabo correctamente, puede dar lugar a graves consecuencias en la seguridad y calidad del producto. Por ejemplo, las redes de distribución de la industria alimentaria son un medio para el crecimiento de biofilm al contener las condiciones ambientales necesarias para su formación genera la contaminación microbiana, que induce el deterioro del producto y las enfermedades transmitidas por los alimentos. Algunos microorganismos patógenos que afectan a los productos alimenticios son *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycobacteria* spp., los mismos que pueden crecer y adherirse en los alimentos y en las paredes de los equipos de procesamiento formando biopelículas (Fratamico, Annous, & Gunther, 2009).

El sistema de limpieza CIP es automatizado e in situ para superficies internas de tuberías, recipientes, filtros, bombas, válvulas, intercambiadores de calor, equipos de proceso, es decir, sin desmontaje del equipo de producción. Este régimen de saneamiento asegura la eliminación de sustancias orgánicas e inorgánica, y la desinfección garantiza la eliminación de microorganismos en la superficie en un 99,9% y la eliminación de los residuos de los agentes de saneamiento (Thomas & Sathian, 2014).

Por otra parte, la eficiencia de la limpieza del sistema tiene correlación con la actividad mecánica, térmica y química. Los principales factores que están relacionados con la efectividad son: la naturaleza del material que se va a eliminar, el diseño de la planta, el tipo de superficie que se desea limpiar, la concentración

y naturaleza de la solución de limpieza, así como, la temperatura y el tiempo de la etapa de limpieza (Bremer, Phil & Seale, 2010).

**Tabla 1.1 Factores que influyen en un proceso de limpieza CIP**

<b>Factor</b>	<b>Característica</b>
Tiempo de contacto	El tiempo es necesario para que los agentes de limpieza tengan efecto.
Sustancias químicas	Controlar la concentración y el tipo de detergente a usar.
Turbulencia	La presión del fluido influye en la limpieza.
Temperatura	Es importante para la transferencia de masa y características del fluido.
Tipo de suciedad	Definir si el material a limpiar es orgánico o inorgánico.

**Fuente:** (Moerman, Frank, Rizoulières & Majoor, 2013)

Elaboración propia

El proceso de limpieza Clean in Place (CIP) inicia con la remoción de material, lo cual conlleva a la aplicación de procesos mecánicos o automatizados (aire comprimido, agua), luego se procede con la circulación del detergente para cumplir con la efectividad de remover agentes contaminantes, debido a la suspensión o dilución de estos en la solución del detergente. Usualmente los circuitos de limpieza programado utilizan tiempos entre 15 minutos a 1 hora. El enjuague tiene como propósito remover rastros de detergente, suciedad y espuma, así como también la recuperación del detergente. Posteriormente, se agrega un desinfectante como, por ejemplo, ácido peracético. Culminando con el enjuague final con agua fría y potable, siendo la calidad del agua lo más importante, ya que al no tener cuidado se tendría que realizar una post desinfección (Watkinson, 2009).

Las pruebas de limpieza cumplen un importante papel para desarrollar formulaciones de detergente eficaces para fines específicos como la reducción de la cantidad de energía que requieren las operaciones de limpieza, por lo tanto, el desarrollo de pruebas de limpieza para la industria alimentaria continúa siendo una necesidad (Jurado Alameda, Altmajer Vaz, García Román, & Siqueira Curto Valle, 2016)

### **1.4.2 Compuestos de limpieza alcalina**

El pH, una medida logarítmica de la concentración de iones de hidrógeno, se usa con frecuencia en la industria de saneamiento de alimentos para describir la naturaleza de la solución de limpieza. Generalmente, las grasas, aceites y proteínas requieren limpiadores alcalinos con un pH de 11 o más, pero la desventaja de estos detergentes es que carecen de valor para el control de depósitos de minerales.

#### **Limpiadores fuertemente alcalinos**

Se caracterizan por su gran poder de disolución y son muy corrosivos. Pueden lastimar o dañar permanentemente el tejido y en algunos casos inhalar los humos puede causar daños en el tracto respiratorio. Mezclar estos limpiadores alcalinos fuertes con agua provoca una reacción exotérmica. Son buenos para eliminar la suciedad pesada, como los hornos comerciales (Marriot, Wes, & Gravani, 2006). Los detergentes alcalinos suelen tener como formulación base: agua, soda cáustica, gluconato de sodio y fosfato trisódico.

#### **Soda cáustica**

A temperatura ambiente se presenta como un sólido blanco cristalino que no tienen olor y absorbe la humedad del aire. Libera calor en contacto con agua o cuando se neutraliza en ácido. Tiene una gran actividad germicida, disolución de proteínas y propiedades de desfloculación/emulsificación, se usa para eliminar la suciedad más pesada (Marriot, Wes, & Gravani, 2006).

#### **Fosfato trisódico**

Es un agente de limpieza, removedor de grasa y desengrasante. Es un sólido cristalino parecido a la arena, de color blanco e inodoro, es muy soluble en agua produciendo una solución alcalina. Es utilizado como ablandador de agua para detergentes. Los riesgos que presenta el fosfato trisódico son al inhalarlo y al tener contacto porque es irritante, pudiendo afectar la piel, ojos, nariz y garganta. Esta sustancia al ser un fosfato presenta problemas ecológicos como la eutrofización (Yonghong, y otros, 2018).

### **Gluconato de sodio**

Es un polvo cristalino blanco con alta solubilidad en agua, no tóxico, no corrosivo y fácilmente biodegradable. Las soluciones acuosas de gluconato de sodio son resistentes a la oxidación y la reducción a altas temperaturas, y es muy adecuado para eliminar depósitos de cal en superficies metálicas. Además, este producto es un buen quelante a un pH alcalino que supera en algunos aspectos a otros quelantes disponibles en el mercado. como un agente de limpieza de superficies para acero y vidrio (Akhmetov, Gumarov, Petukhov, & Volkov, 2019).

### **Ácido peracético**

El ácido peracético (PAA) tiene un amplio espectro de desinfectantes y es efectivo contra muchos microorganismos como bacterias (coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* y *Salmonella spp.*), virus y quistes de protozoos. Exhibe una eficiencia similar o superior a la de la radiación ultravioleta porque es un agente oxidante fuerte. La principal ventaja de su aplicación en relación con los desinfectantes clorados es su bajo potencial para la formación de subproductos tóxicos, ya que los compuestos clorados pueden reaccionar con la materia orgánica para generar subproductos cancerígenos, convirtiendo al PAA un sustituto prometedor para los desinfectantes clorados (Pereira, Thayrine, Soares, & Henrique, 2019).

### **1.4.3 Biotensioactivos**

#### **Propiedades y clasificación**

Los biotensioactivos son compuestos orgánicos anfifílicos que están conformados por un grupo hidrofóbico (cola) y grupo hidrofílico (cabeza) y son capaces de reducir la tensión superficial y la tensión interfacial entre la molécula individual en la superficie y la interfaz (Mordor Intelligence, 2019).

En cuanto a las propiedades de los biotensioactivos es de destacar la acción de humectación, penetración, propagación, hidrofiliidad e hidrofobicidad, emulsificación, detergencia, gelificación, capacidad de formación de espuma,

floculación, valores de baja concentración micelar crítica (CMC), secuestro de metales pesados y acción antimicrobiana (Paraszkiewicz et al., 2019).

En el ámbito industrial se los emplea en formulaciones de detergentes, como agentes de limpieza doméstica, pesticidas, en la producción textil, agricultura, alimentación e industrias farmacéuticas (Nwaguma, Chikere, & Okpokwasili, 2019).

**Tabla 1.2 Ventajas de biotensioactivo sobre sus homólogos químicos**

<b>Ventajas</b>	<b>Descripción</b>
Biodegradabilidad	Baja toxicidad y estructura química específica que se degrada y no es persistente en el medio ambiente
Biocompatibilidad y digestibilidad	Aplicación en cosméticos, productos farmacéuticos y productos alimenticios
Disponibilidad de materias primas	Materia prima económica
Economía de producción aceptable	Producido de desechos agroindustriales
Biotecnología ambiental	Agentes que aceleran la biodegradación y la desintoxicación de efluentes industriales y biorremediación del suelo
Especificidad	Desintoxicación de contaminantes específicos, la desemulsión de emulsiones industriales, el desarrollo de aplicaciones cosméticas, farmacéuticas y alimentarias específicas
Eficacia	Temperaturas extremas, pH y salinidad

**Fuente:** (Nitschke & Silva, 2018)

Elaboración propia

### **Control de biopelículas con biotensioactivos**

Un biofilm se define como una comunidad heterogénea de microorganismos dentro de una matriz polimérica extracelular (EPM, por sus siglas en inglés) adherido a una superficie biótica o abiótica.

Los desinfectantes químicos comunes tienen el poder de eliminar células planctónicas, pero generalmente son menos efectivos para actuar sobre biopelículas porque las células microbianas son protegidas por EPM. Por lo tanto, la aplicación de biotensioactivos en las superficies es de utilidad, ya que reduce

la adhesión de las células microbianas y es eficiente en la reducción de la colonización en la superficie (Mukherjee, 2007).

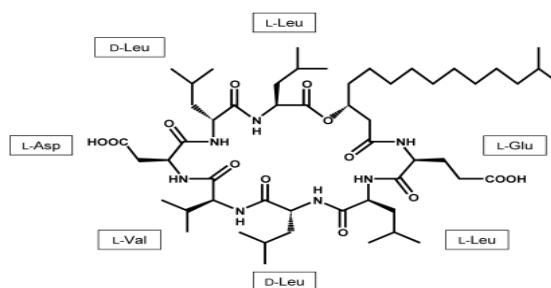
### Detergentes con biotensioactivos

Los detergentes se someten a un rendimiento de lavado entre un rango de temperatura de 25 a 60 °C, por lo tanto, el uso de biotensioactivos de *B. subtilis* en las formulaciones de detergentes, no se vería afectado debido a las propiedades que poseen estos ingredientes como son la resistencia térmica y extrema estabilidad de pH. Además, los tensioactivos son eficientes en cuanto a sus propiedades espumantes y emulsificantes, las cuales dependen especialmente de su estructura anfifílica (Mukherjee, 2007).

### Biotensioactivo: Surfactina

La surfactina es un lipoheptapéptido, con la capacidad de reducir la tensión superficial del agua hasta 27 mN/m y posee una concentración micelar crítica (CMC) bajas de 0.01 g/L. La estructura de la surfactina está conformada por un heptapéptido unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -amino de longitud variable C13-C15 (Takahashi et al., 2006). Como se puede apreciar con más detalles en la Figura 1.1.

Además, es un anillo de macrolactona que se cierra por la reacción de catalización entre el ácido graso  $\beta$ -hidroxilo y el péptido C-terminal (Takahashi et al., 2006).



**Figura 1.1 Estructura de la surfactina**

Fuente: (Takahashi et al., 2006)

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

Los detergentes alcalinos biodegradables fueron formulados a base de un biotensioactivo microbiano obtenido a partir de la cepa *Bacillus subtilis* DS23. Para determinar la efectividad de los detergentes formulados se realizaron pruebas de prevención de la adherencia de los microorganismos. Luego, la formulación que presentó mejores resultados fue seleccionada para realizar la prueba de eliminación de la adherencia de los microorganismos. Los microorganismos utilizados para las pruebas in vitro fueron *Escherichia coli* ATTC 11775 (Gran negativa) y *Bacillus cereus* ATTC 10876 (Gran positiva), obtenidas del banco de cultivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato (UTA).

Finalmente, con la fórmula que presentó los mejores resultados se realizaron también pruebas de limpieza in situ (CIP) en un evaporador de película ascendente ubicado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP – ESPOL). Después de procesar una muestra de alimento como leche, se inició con el sistema de limpieza CIP en donde se circuló la concentración del detergente biodegradable al 5% p/v y el desinfectante (ácido peracético) a 200 ppm, para la remoción de la suciedad y reducción de la carga microbiana, respectivamente.

### 2.1 Formulación de detergentes

La elaboración del detergente con biotensioactivo se realizó con componentes químicos que controlan el crecimiento microbiano como lo indica la FDA en la norma 21 CFR “Code of Federal Regulations Section 21” parte 178.1010: detergentes y sanitizantes para el procesamiento de alimentos (ECFR, 2019).

Los ingredientes utilizados fueron los detallados en la tabla 2.1, mismos que fueron suministrados por la empresa Chemical Clean, a excepción del agua

desmineralizada y el tensioactivo microbiano que fueron suministrados por la carrera Ingeniería en Alimentos de la FIMCP-ESPOL.

El biotensioactivo utilizado fue obtenido a partir de la fermentación líquida de la bacteria *Bacillus subtilis* DS23, aislada a partir de cultivo de cacao. La bacteria aislada fue cultivada en un medio mineral con glucosa como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, por 24 horas a 37 °C. Luego del tiempo de incubación, se realizó la separación de la biomasa por centrifugación. Una vez obtenido el sobrenadante libre de células, se realizó un precipitado con ácido clorhídrico al 37%, se refrigeró la solución a 10 °C por 20 horas, lo cual provoca que el biotensioactivo precipite por pérdida de su carga. Finalmente, se realizó la recuperación del biotensioactivo por centrifugación a 5000 rpm a 4 °C, obteniéndose el producto sólido.

Para el uso del biotensioactivo, se preparó una solución estéril de 800 mg/L y se agregó las concentraciones respectivas a cada formulación establecida en la tabla 2.1.

Como primer paso para la elaboración de los detergentes se realizó en un vaso de precipitación la mezcla del 85% del agua desmineralizada con la soda cáustica líquida al 50%, según las concentraciones establecidas para cada formulación (tabla 2.1); se mezcló por 5 minutos y se dejó enfriar por 12 horas. Luego, en un segundo vaso de precipitación se realizó la mezcla del gluconato de sodio con el 10% de agua desmineralizada, lo cual se agitó por 10 minutos, posteriormente se adicionó el tripolifosfato de sodio y se dejó en agitación continua por 10 minutos más. El contenido de este segundo vaso de precipitación fue vertido en el primer vaso, inmediatamente se adicionó el biotensioactivo según las formulaciones, esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 5 minutos. A continuación, se preparó el color caramelo líquido, para lo cual fue necesario diluirlo en el 5% de agua caliente (80 °C), mezclándose por 10 minutos. Finalmente, se mezcló la dilución del colorante en el primer vaso de precipitación. Se almacenaron las formulaciones en envases de polietileno de alta densidad, protegidos de la luz y a temperatura ambiente.



**Tabla 2.1 Formulaciones de detergentes alcalinos**

Materia prima	Fórmula	Fórmula	Fórmula	Fórmula	Fórmula	Fórmula
	1 F1 (%)	2 F2 (%)	3 F3 (%)	4 F4 (%)	5 F5 (%)	6 F6 (%)
Soda cáustica líquida al 50%	C	B	A	C	B	A
Gluconato de sodio	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Tripolifosfato de sodio	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Color caramelo líquido	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Biotensioactivo ( <i>Bacillus subtilis</i> )	M	M	M	m	m	m
Agua desmineralizada	c.s.p.100	c.s.p.100	c.s.p.100	c.s.p.100	c.s.p.100	c.s.p.100

Fuente: elaboración propia

Las diferentes concentraciones de los ingredientes de las 6 fórmulas de detergente biodegradable fueron ajustadas considerando las concentraciones de los componentes de la fórmula base, suministrada por la empresa Chemical Cleans, pero con la adición del biotensioactivo, con un valor alto (M) y un valor bajo (m), reduciendo la concentración de soda líquida al 50% en 3 valores (A, B y C) siendo A el porcentaje más alto del ingrediente y C el más bajo.

## 2.2 Parámetros fisicoquímico de detergentes alcalinos

### 2.2.1 Determinación de pH

En vasos precipitados se prepararon 100 ml de solución al 1% de cada fórmula de los detergentes alcalinos con agua destilada, y se procedió a su lectura en el potenciómetro (Thermo Scientific Orion 5 Star, país).

### **2.2.2 Determinación de la densidad**

La densidad se determinó por el método de la probeta que consistió en pesar la probeta vacía y seca, se llenó con 50 ml del detergente alcalino y luego se pesó todo en conjunto. La densidad fue determinada según la ecuación 2.1.

$$\rho = m/v \quad (2.1)$$

Donde:

$\rho$ : densidad

$m$ : masa

$v$ : volumen

### **2.3 Preparación de las superficies de ensayo**

Las superficies de ensayo fueron placas de acero inoxidable 316 de 10 cm<sup>2</sup> y 12.5 cm<sup>2</sup>. Previamente a los ensayos, las placas de acero inoxidable fueron lavadas de manera individual con agua destilada esterilizada, secadas y posteriormente, se limpiaron con alcohol al 70% (v/v). Luego de este proceso de sanitización, nuevamente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se secaron durante 2 horas a 60 °C en estufa. Finalmente, se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos.

### **2.4 Prevención de la adherencia de microorganismos**

Las superficies de ensayo fueron tratadas con concentraciones del 2% de las formulaciones desarrolladas.

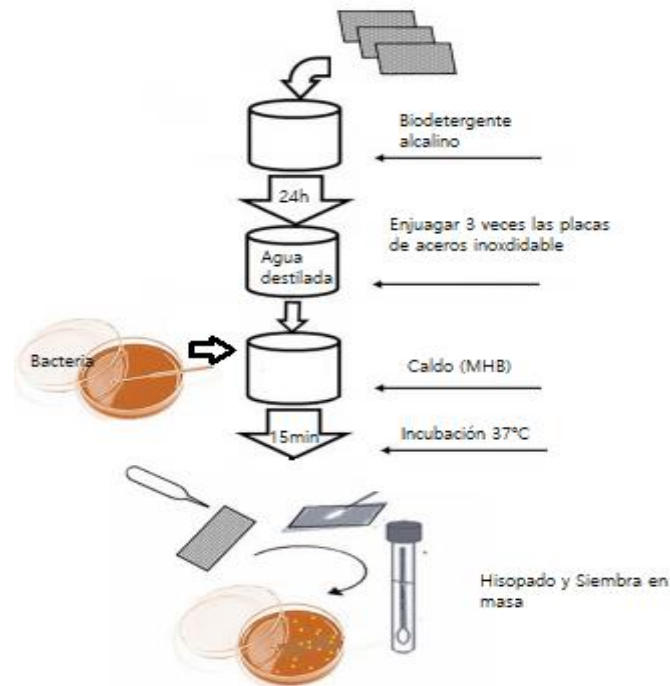
Inicialmente, en vasos de precipitación estériles de 600 ml se prepararon con agua destilada esterilizada 350 ml de soluciones al 2% de las 6 fórmulas del detergente biodegradable. Se sumergieron las placas de acero inoxidable, previamente preparadas (sección 2.2), en las diferentes soluciones y se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente. Además, se realizaron placas de control tratadas solo con agua destilada esterilizada. Después de este tiempo se eliminó la solución del detergente, sumergiendo 3 veces las placas en agua destilada esterilizada.

A partir de una placa de cultivo de colonias de *E. coli* y *B. cereus* de 24 horas, se prepararon, por separado, en vasos de precipitado con caldo Mueller Hilton (MHB),

soluciones con turbidez 0.5 de la escala de McFarland, lo cual corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml (Perilla, y otros, 2003).

A continuación, las placas pretratadas con las diferentes formulaciones de detergentes se sumergieron durante 15 minutos a 37 °C en las diferentes soluciones de MHB inoculado. Pasado este tiempo, la suspensión celular se eliminó enjuagando las placas tres veces con agua destilada esterilizada. Luego, las placas de acero fueron hisopadas y sembradas en agar PCA siguiendo el método descrito en el apartado 2.6. El porcentaje de la prevención de la adherencia de microorganismos se obtuvo a partir de la ecuación descrita en el apartado 2.7. En la figura 2.1 se muestra el esquema del procedimiento realizado para la prueba de prevención de adherencia de microorganismos.

Al obtener la mejor fórmula, se realizó la misma prueba de prevención de la adherencia de microorganismos, pero utilizando una concentración al 5%.



**Figura 2.1 Esquema de prevención de la adherencia de microorganismos**

Fuente: Elaboración Propia

El análisis de los datos se realizó en tablas representativas del porcentaje de prevención de la adherencia de microorganismos, con el propósito de obtener la fórmula con mayor efectividad en la prevención de la adherencia de microorganismos.

Como se muestra en la tabla 2.2, se planteó un diseño para el análisis de las 6 formulaciones del detergente biodegradable, para lo cual se consideraron como factores de estudio las concentraciones de los ingredientes: soda cáustica líquida al 50%, biotensioactivo y tipo de microorganismo. En donde las concentraciones analizadas de soda líquida fueron A, B y C, que representan un nivel alto, medio y bajo de porcentaje de soda en el producto, respectivamente; mientras que para el biotensioactivo se analizaron concentraciones de un nivel alto (M) y bajo (m). Además, los microorganismos para las pruebas fueron *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*.

**Tabla 2.2 Factores, niveles y variables de respuesta de la experimentación**

Factores	Niveles	Variables de respuestas
% de soda cáustica líquida al 50%	Alto (A) Medio (B) Bajo (C)	Porcentaje de prevención de la adherencia de microorganismo
% de biotensioactivo	Alto (M) Bajo (m)	
Tipo de microorganismo	<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i>	

Fuente: elaboración propia

## 2.5 Eliminación de la adherencia de microorganismos

Se añadieron 206 ml de MHB previamente esterilizados y 144 ml de MHB que contenía el cultivo bacteriano (*E. coli* o *B. cereus*) con turbidez 0.5 de la escala de McFarland, a un vaso de precipitación que contenía una barra magnética (ambos materiales también esterilizados). Se sumergieron en el interior del vaso de precipitación las placas de acero inoxidable, previamente preparadas (sección

2.2), y el vaso fue cubierto con papel aluminio e incubado a 37 °C con agitación constante de 50 rpm. Cada 48 h, las placas de acero inoxidable fueron retiradas del vaso de precipitación y sumergidas tres veces en una solución de NaCl al 0.5% para eliminar las células planctónicas, y nuevamente eran colocadas en 350 ml de MHB contenidos en un vaso de precipitación con una barra magnética; tanto el MHB como el vaso de precipitación con la barra magnética eran esterilizados previamente. El sistema se selló y se incubó a 37 °C con agitación a 50 rpm. Este procedimiento se repitió cada 48 h, completando 196 horas de incubación, para formar una biopelícula madura de cada uno de los microorganismos por separado. Este método se aplicó a la formulación más efectiva escogida en la prevención de la adherencia de microorganismos, así como a la fórmula base.

Pasada las 196 horas, las placas fueron sumergidas 3 veces en una solución de NaCl al 0.5% para enjuagarlas y eliminar las células que no se encontraban adheridas en el biofilm. Se las dejó reposar por 1 hora en 350 ml de una solución al 5% de la fórmula seleccionada, por separado, a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, las placas de acero fueron lavadas con agua esterilizada para eliminar el detergente, después hisopadas y sembradas en agar PCA siguiendo el método descrito en el apartado 2.6. El porcentaje de la eliminación de la adherencia de microorganismos se obtuvo a partir de la ecuación descrita en el apartado 2.7.

Para evaluar el comportamiento de las formulaciones en cuanto a la eliminación de la adherencia de microorganismos se utilizó tablas representativas.

## **2.6 Método de hisopado y recuento microbiano**

El método de hisopado es un protocolo de gestión de seguridad alimentaria en industria para detectar bacterias, para el cual se extrae muestras a través de superficie de contacto para su detección, ya sea plástico, acero inoxidable o madera.

El procedimiento consistió en utilizar un hisopo estéril, con el cual se realizó un frotis en dos direcciones sobre las placas de acero, luego el hisopo se colocó en

10 ml de agua de peptona y se agitó en un vórtex durante 2 minutos para liberar los microorganismos presentes. A partir de esa dilución se realizaron 5 diluciones decimales en agua de peptona. Se realizó la siembra de las diluciones decimales en agar PCA mediante el método de siembra en masa, y se incubó a 37 °C por 24 horas. Para el recuento de microorganismos se aplicó la fórmula 2.2, de acuerdo a las indicaciones establecidas en la NTE INEN 1529-5:2006 (INEN, 2006).

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2)d} \quad (2.2)$$

En donde:

$\sum C$ : Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas

$V$ : Volumen inoculado en cada caja Petri

$n_1$ : Número de placas de la primera dilución seleccionada

$n_2$ : Número de placas de la segunda dilución seleccionada

$d$ : Factor de dilución de la primera dilución seleccionada

## 2.7 Cálculo de reducción de la carga microbiana

El cálculo de la reducción de la carga microbiana se realizó según lo indicado por (Jemil et al., 2017), a través de la ecuación que se muestra a continuación:

$$\% E = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100\% \quad (2.3)$$

Donde:

$N_0$ : Recuento inicial obtenido en la prueba de viabilidad.

$N_t$ : Recuento final obtenido luego de estar en contacto el microorganismo con el detergente durante un tiempo estimado del estudio.

## 2.8 Operación de limpieza CIP en evaporador de película ascendente

El evaporador de película ascendente de marca Armfield FT22 tiene una capacidad de 30 Litros de alimentación y una bomba CIP con una capacidad 8 L/min a 20 pies de agua.

Para el proceso de evaporación se utilizaron 3 litros de leche con un flujo de 7 L/h y una temperatura de 71 °C. Luego, se procedió a realizar la limpieza del equipo de

acuerdo a las indicaciones del proveedor de químicos, Chemical Cleans, y al manual técnico del equipo.

El ciclo del proceso de limpieza CIP consta de 5 fases en el evaporador las cuales se pueden apreciar en la tabla 2.3. El sistema de limpieza CIP se modificó en la segunda etapa (fase alcalina) utilizando el detergente químico o el biodegradable.

**Tabla 2.3 Etapas del sistema de limpieza CIP convencional**

<b>Fases</b>	<b>Descripción</b>
Primera fase	Pre-enjuague: Agua a 60 °C por 15 min.
Fase alcalina	Detergente: Detergente alcalino al 5% p/v por 15 min a 60 °C
Tercera fase	Enjuague intermedio: Agua a 60 °C por 15 min.
Fase ácida	Desinfectante: Ácido peracético, 200 ppm por 15 min a 60 °C
Quinta fase	Enjuague final: Agua a 60 °C por 15 min.

**Fuente:** elaboración propia

El equipo trabajó en su máxima capacidad de funcionamiento de las bombas con la finalidad de obtener un flujo turbulento, dando paso a un flujo aproximado de 17 L/h con la bomba de vacío, mientras que, con la bomba CIP fue de 8 L/min.

Se tomaron muestras del pre-enjuague, obtenidas después de la evaporación de la leche, para lo cual se pasaron 15 litros de agua por el evaporador. Asimismo, se tomaron muestras del enjuague intermedio y del enjuague final, procedentes del sistema de limpieza CIP. Se realizó la siembra de las diluciones decimales de las muestras de agua en agar PCA mediante el método de siembra en masa, para la detección de aerobios mesófilos. El recuento de colonias se realizó de acuerdo con la ecuación 2.2.

Se evaluó la eficiencia del proceso CIP con el detergente biodegradable versus el detergente químico convencional en cuanto al porcentaje de reducción de la carga bacteriana, misma que se obtiene a partir de la ecuación 2.3. El análisis de datos se realizó por medio de tablas para la comparación de ambos procesos.

## **2.9 Análisis económico**

Para realizar la estimación de costos se tomó en cuenta las siguientes condiciones: presentación del producto de 20 Kg en bidones (envase ideal para el tipo de detergente), 8 horas laborables al día y 20 días por mes. Se determinaron los costos de materia prima, mano de obra directa e indirecta, suministros de producción y los gastos administrativos, así como el punto de equilibrio.

Se realizó una comparación entre el precio de venta al público del detergente alcalino biodegradable y detergente alcalino, para saber si es factible producir 1650 unidades del producto.



# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos

En la tabla 3.1 se muestran los valores de pH y densidad de cada una de las fórmulas de los detergentes biodegradables analizados, así como de la fórmula base. Los detergentes biodegradables estudiados tuvieron valores de pH entre 11.17 y 12.17, considerándose así detergentes alcalinos.

**Tabla 3.1 Valores de pH y densidad de las formulaciones**

Fórmulas	pH (sol. 1%)	Densidad (g/ml)
F1	12.17	1.07
F2	12.16	1.14
F3	11.17	1.16
F4	11.53	1.16
F5	11.68	1.10
F6	12.13	1.16
FB	11.88	1.47

Fuente: elaboración propia

De manera general, en los detergentes biodegradables se observó una tendencia con el uso de la concentración más alta de biotensioactivo, ya que las formulaciones F1 y F2 presentaron los valores más altos de pH en comparación con las otras formulaciones; sin embargo, la fórmula F3 presentó un valor menor a pesar de tener la concentración más alta de soda cáustica líquida al 50% y la concentración más alta de biotensioactivo, esto podría ser ocasionado por la reacción entre estos compuestos produciendo un pH de 11.17. Mientras que, en las formulaciones con la menor concentración de biotensioactivo se observó que el detergente era más alcalino a medida que aumentaba el valor de soda líquida al 50%. La disminución de las densidades en las formulaciones con el biotensioactivo con respecto al detergente convencional fue atribuida a la reducción porcentual de soda cáustica líquida al 50%.

El hidróxido de sodio y los detergentes alcalinos (a pH 10-13) son utilizados comúnmente en los procesos CIP en la industria de alimentos. (Gibson et al., 1999) probó que, a pH alto, el cloro, en combinación con hidróxido de sodio contribuyen a la actividad bactericida de los limpiadores alcalinos, por lo que un valor de pH alcalino es una característica deseada en los detergentes utilizados en la industria.

### 3.2 Prevención de la adherencia de microorganismos

Se evaluó la efectividad de las 6 fórmulas de detergentes alcalinos biodegradables, a través del porcentaje de prevención de la adherencia de dos tipos de bacterias: *Escherichia coli* ATTC 11775 (Gram negativa) y *Bacillus cereus* ATTC 10876 (Gram positiva) sobre placas de acero inoxidable tratadas con concentraciones al 2% de las fórmulas por 24 horas.

Los porcentajes de prevención de la adherencia de los microorganismos se muestran en la tabla 3.2. Se observó mayor efectividad en la prevención de *B. cereus* para las fórmulas con mayor concentración de biotensioactivo (F1, F2 y F3), mientras que las fórmulas con menor concentración de biotensioactivo (F4, F5 y F6) fueron más eficaces en prevenir la adherencia de *E. coli*, pero en menores porcentajes que las fórmulas F1, F2 y F3 contra *B. cereus*.

**Tabla 3.2 Porcentajes de prevención de adherencia de microorganismos para las 6 fórmulas del detergente biodegradable al 2%**

Bacteria	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)	F6 (%)
<i>E. coli</i>	8.57	0.00	0.00	20.55	12.99	90.63
<i>B. cereus</i>	96.00	65.79	30.77	40.00	0.00	0.00

Fuente: elaboración propia

De las pruebas realizadas se pudo observar que las fórmulas que mejores resultados mostraron fueron la fórmula 1 (F1) y la 6 (F6). La F1 producida con la concentración más alta de biotensioactivo (M) y la cantidad más baja de soda líquida al 50% (C) presentó la mayor prevención de adherencia para *B. cereus* (96.00%). Mientras que, la F6, constituida por la concentración más baja de biotensioactivo (m) y la cantidad más alta de soda líquida al 50% (A) presentó el

mayor porcentaje de prevención de adherencia para *E. coli* con un 90.63%, siguiendo una tendencia similar a la fórmula base que presentó un mayor porcentaje de prevención de adherencia para *E. coli* (72.50%) que para *B. cereus* (41.67%).

Según (Raaijmakers et al., 2010), la surfactina denominada como biotensioactivo producida a partir de la cepa *Bacillus subtilis*, tiene la capacidad de regular las propiedades de la superficie celular de microorganismos, lo cual puede interferir en la unión de las células a las superficies, propiedad que pudo conferir a las fórmulas con mayor concentración de biotensioactivo una mayor capacidad de prevención de la adherencia de las cepas de *B. cereus* con una reducción de 1.4 log (Ver Apéndice 2).

(Nitschke et al., 2009) realizaron experimentos con superficies de acero inoxidable, de naturaleza hidrofílica, las cuales fueron acondicionadas con surfactina, y concluyeron que luego del tratamiento con el tensioactivo, la naturaleza de la superficie del acero inoxidable se vio alterada, haciéndola menos hidrofílica, lo que disminuyó la adhesión de *Listeria monocytogenes* (bacteria Gram positiva en estudio). Además, otro factor importante para la adhesión al acero inoxidable fue la carga neta de la célula bacteriana (característica que puede cambiar con la temperatura y condición del medio). Se podría establecer entonces que al ser *B. cereus* una bacteria Gram positiva, su adherencia se pudo ver afectada por estos dos factores antes mencionados; mientras que para *E. coli* es posible que la carga superficial del acero se haya visto alterada en función de ser más compatible con la carga superficial de la bacteria.

De las dos fórmulas que presentaron mejores resultados se seleccionó la F1 por tener menor concentración de soda líquida al 50% en comparación con la F6, y esto podría conllevar a que la F1 sea un producto menos irritante, corrosivo y dañino para las especies acuáticas. Además, hubo un porcentaje de prevención de la adherencia para *E. coli* (8.57%), a diferencia de la F6 que no presentó prevención alguna contra *B. cereus*.

Para comprobar la eficacia del detergente base (FB) versus la F1, se decidió aumentar la concentración del producto al 5%, estos resultados se muestran en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3 Porcentajes de prevención de la adherencia de microorganismos con la fórmula F1 y la fórmula base FB al 5%**

<b>Bacteria</b>	<b>F1 (%)</b>	<b>FB (%)</b>
<b><i>E. coli</i></b>	8.70	97.58
<b><i>B. cereus</i></b>	99.68	55.71

Fuente: elaboración propia

En estas pruebas se demostró que a pesar del incremento de la concentración del detergente biodegradable (F1), la prevención para *E. coli* no aumentó, mientras que la de *B. cereus* si lo hizo. Sin embargo, en la FB hubo un aumento para ambos porcentajes de prevención, manteniendo la tendencia de la F1 de prevenir la adherencia de *B. cereus* en mayor medida que la FB.

### **3.3 Eliminación de la adherencia de microorganismos del detergente biodegradable seleccionado y detergente base**

Se probó la efectividad de la solución del detergente de la F1 y la FB a una concentración del 5% en biopelículas de 192 horas de formación de *B. cereus* y *E. coli*, luego de 60 minutos de actuación de las fórmulas.

En la tabla 3.4 se pueden observar los porcentajes de eliminación de la adherencia y la reducción logarítmica de las biopelículas de *E.coli*, las mismas que fueron removidas en mayor medida por el tratamiento del detergente alcalino (FB) con un 99.98% de eliminación, correspondientes a una reducción de 3.76 log UFC/cm<sup>2</sup>, en relación con el número inicial de células en la biopelícula; mientras que, la F1 tuvo una eliminación del 99.90%, correspondiente a una reducción de 3 log UFC/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, comparando las diferencias entre las reducciones de los tratamientos con las reducciones del control (biopelículas eliminadas solo con agua), ambos detergentes eliminaron 0.82 log UFC/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 3.4 Porcentaje de eliminación de la adherencia y reducción logarítmica de biopelículas de *E. coli***

Fórmulas	Tratamiento (sol. 5%)		Control	
	Porcentaje de eliminación (%)	Reducción de la población (log UFC/cm <sup>2</sup> )	Porcentaje de eliminación (%)	Reducción de la población (log UFC/cm <sup>2</sup> )
<b>F1</b>	99.90	3.00	85.00	2.18
<b>FB</b>	99.98	3.76	85.00	2.93

Fuente: elaboración propia

En la tabla 3.5 se muestran los resultados de la eliminación de la biopelícula de *B. cereus*, para la cual se evidenció con la F1 un mayor porcentaje de la eliminación (99.99%), correspondiente a una reducción de 4.19 log UFC/cm<sup>2</sup>, versus el tratamiento FB que mostró una reducción de 3.59 log UFC/cm<sup>2</sup>. Al igual que con la biopelícula de *E. coli*, si se compara la reducción logarítmica luego del tratamiento control (solo agua), la reducción para ambos tratamientos con detergentes es la misma, siendo esta 1.79 log UFC/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 3.5 Porcentaje de eliminación de la adherencia y reducción logarítmica de biopelículas de *B. cereus***

Fórmulas	Tratamiento (sol. 5%)		Control	
	Porcentaje de eliminación (%)	Reducción de la población (log UFC/cm <sup>2</sup> )	Porcentaje de eliminación (%)	Reducción de la población (log UFC/cm <sup>2</sup> )
<b>F1</b>	99.99	4.19	98.40	2.40
<b>FB</b>	99.97	3.59	98.40	1.80

Fuente: elaboración propia

Para la eliminación de las biopelículas se volvió a observar que la FB tiene mayor efecto sobre las células de *E. coli*, mientras que la F1 lo tiene sobre *B. cereus*.

La forma de acción del detergente biodegradable sobre las células podría explicarse de acuerdo con lo mencionado por (Deleu et al., 2003), quienes mostraron que la surfactina influye en la solubilización de la membrana por medio de dos mecanismos de acción: el primero consiste en una baja concentración de

surfactina penetrando en la membrana de eritrocitos interactuando a través de su cadena de ácidos grasos, y la segunda ocurre a una concentración cercana a la concentración micelar crítica (CMC), la surfactina se autoasocia para formar micelas que involucran los fosfolípidos de membrana, provocando lisis celular. Por ello, podría ser que el detergente biodegradable al estar compuesto de una alta concentración de biotensioactivo actúe de esta forma sobre las biopelículas de *B. cereus* y *E. coli* conllevándolas a su dispersión y eliminación sobre las placas de acero inoxidable.

### **3.4 Evaluación de la operación de limpieza CIP en evaporador de película ascendente**

Para comprobar la funcionalidad de las ambas fórmulas se realizó un proceso de evaporación de leche para cada detergente en el evaporador de película ascendente (Figura 3.1), para luego realizar los procesos de limpieza CIP: CIP F1 (detergente biodegradable) y CIP FB (detergente base). En las fases de limpieza de los sistemas CIP se aplicaron los detergentes (biodegradable y base) a concentraciones del 5%, y para la fase de desinfección de ambos procesos se usó un sanitizante (ácido peracético) a concentración de 200 ppm.



**Figura 3.1 Evaporador de película ascendente alimentado con leche ubicado en el Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Alimentos de la FIMCP-ESPOL**

En la tabla 3.6 se muestran los resultados de la carga inicial del equipo luego de la circulación de la leche y el primer enjuague, así como de los enjuagues intermedios (luego del detergente) y final (luego del sanitizante), para cada proceso.

**Tabla 3.6 Resultados del conteo de aerobios mesófilos en UFC/ml de los procesos de limpieza del sistema CIP**

Proceso	CIP F1			CIP FB		
	Carga microbiana (UFC/ml)	Reducción microbiana (%)	Reducción logarítmica (log UFC/ml)	Carga microbiana (UFC/ml)	Reducción microbiana (%)	Reducción logarítmica (log UFC/ml)
Enjuague inicial	2.6 x 10 <sup>4</sup>	-----	-----	2.2 x 10 <sup>4</sup>	-----	-----
Enjuague intermedio	8.7 x 10 <sup>2</sup>	96.65	1.48	5.0 x 10 <sup>3</sup>	76.89	0.64
Enjuague final	1.9 x 10 <sup>2</sup>	99.27	2.14	5.7 x 10 <sup>2</sup>	97.35	1.58

Fuente: elaboración propia

El proceso CIP FB presentó un efecto bactericida del 76.89% con una reducción logarítmica de aerobios mesófilos de 0.64 con relación al enjuague inicial; en cambio el proceso CIP F1 mostró un efecto bactericida del 96.65% con una reducción logarítmica de aerobios mesófilos del 1.48 con relación al enjuague inicial. Al finalizar el proceso de limpieza, se evidenció que el uso del detergente biodegradable tiene mayor efecto bactericida que el detergente alcalino, ya que la limpieza del equipo fue más efectiva para el proceso CIP F1 con un 99.27% de reducción microbiana, en comparación con el proceso CIP FB con un 97.35%.

### 3.5 Costos

Considerando una producción de 33,000 kg anuales de detergente alcalino biodegradable, se obtienen 1650 bidones con una capacidad máxima de 20 Kg. Para la estimación de costos se consideró un margen de contribución del 50%, obteniendo un P.V.P. de \$49.81 por bidón de 20 kg del detergente biodegradable, con respecto al detergente alcalino de \$51.19 kg, viéndose una reducción de \$1.38 por Kg de producto.

El precio del detergente biodegradable es favorable porque contribuye en un ahorro en la economía de las industrias de químicos, por tener un costo de producción de \$1.21 por kg, menor que el detergente alcalino de \$1.29 por kg, permitiéndole

ahorrar \$0.08 por kg, lo cual corresponde anualmente a \$132.00 por kg, considerándose una ganancia. Además, es eco-amigable y eficiente en la reducción microbiana, lo que lo hace atractivo para el cliente.

### **Costos directos**

Para la estimación de los costos directos se tomó en cuenta los costos de materia prima (información facilitada por la empresa Chemicals Clean) y mano de obra directa, con un valor de \$400.00 para el salario a pagar con una jornada de 8 horas diarias por 5 días a la semana. El costo del tensioactivo fue tomado de (Rivera & Sandoval, 2017). Los datos de la materia prima y mano de obra directa se detallan en el Apéndice 3.

Los costos de materia prima corresponden a \$1.21 por Kg de cada ingrediente perteneciente al detergente biodegradable y un valor anual de \$14,400.00 para la mano de obra directa.

### **Costos indirectos**

Para estimar los costos indirectos se consideraron los costos de mano de obra indirecta, suministros de producción, los gastos administrativos y los gastos de ventas, estos costos permiten estimar cuánto dinero necesita la empresa para poner en marcha la producción, colaboran durante la fabricación del producto porque a través de ellos se puede obtener un producto de calidad en menor tiempo posible y una distribución eficiente al cliente. Estos costos están detallados en el Apéndice 3.

### **Punto de equilibrio**

En la tabla 3.7 se muestra el punto de equilibrio, en la cual se indica que la cantidad de 80 unidades anuales vendidas de detergente biodegradable permite cubrir los costos fijos y costos variable de la industria, es un punto que nos ayuda a saber si hay utilidades o pérdidas, cuando las ventas excedan o caen por debajo de este punto. Las ventas estimadas de producción anual son de 1650 bidones exceden al punto de equilibrio lo que indica que la empresa obtiene utilidades del \$ 78,228.26.



**Tabla 3.7 Punto de equilibrio para el detergente alcalino biodegradable**

<b>Costos fijos anual</b>	\$2,053.57
<b>Costo variable por bidón</b>	\$24.12
<b>P.V.P (20 kg)</b>	\$49.81
<b>Punto de equilibrio (Und)</b>	80

Fuente: Elaboración propia

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- La fórmula 1, elaborada con la mayor concentración de biotensioactivo y la cantidad más baja de soda líquida, tuvo el porcentaje más alto de prevención de adherencia para *Bacillus cereus* (96.00%), mientras que, la fórmula 6 con la menor concentración de biotensioactivo y la cantidad más alta de soda líquida presentó el porcentaje más alto de prevención de adherencia para *Escherichia coli* (90.63%), ambas soluciones en concentraciones del 2%. Entre ambas fórmulas se seleccionó la fórmula 1 por tener mayor porcentaje de prevención y menor porcentaje de soda líquida, pues esto disminuye el riesgo de ser irritante y dañino con las especies acuáticas.
- La fórmula 1 mostró una alta eliminación de la adherencia de biopelículas tanto para *B. cereus* (99.99%) como para *E. coli* (99.90%), valores que fueron similares a los obtenidos por la fórmula base (99.97% para *B. cereus* y 99.98% para *E. coli*), cuando ambos detergentes fueron usados al 5%. Esto demuestra la factibilidad de uso de la fórmula del detergente biodegradable para la eliminación del crecimiento microbiano, al mostrar eliminación de las biopelículas en porcentajes mayores al 90%.
- La surfactina ayuda a la prevención de la adherencia dependiendo del tipo de la bacteria, viéndose reflejado en la fórmula 1 por presentar una preferencia mayor para Gram positivas, en cambio en la fórmula base (sin surfactina) la preferencia es para Gram negativas. Sin embargo, en la eliminación de la adherencia de microorganismos, no se observó que los detergentes presentaran mayores preferencias con respecto al tipo de microorganismo.

- En la limpieza CIP la fórmula 1 tuvo mayor efecto bactericida (96.65%) en comparación con la formula base (76.89%) cuando ambas soluciones fueron evaluadas al 5%, lo que evidencia la factibilidad de usar el detergente biodegradable en un sistema CIP para las industrias alimentarias.
- El uso del detergente biodegradable como agente de limpieza es factible en industrias alimentarias por ser más eco-amigable que un detergente químico convencional, presentar actividad antimicrobiana y tener un P.V.P. aproximado de \$2.49/kg (menor al detergente alcalino, \$2.56/kg), lo cual representa un ente económico atractivo para los clientes.

#### **4.2 Recomendaciones**

- Realizar pruebas bactericidas con la formulación seleccionada utilizando otros microorganismos como modelos y otras superficies de contacto como polipropileno y vidrio.
- Realizar ensayos con diferentes concentraciones del biodetergente para definir la concentración eficaz más baja y optimizar su uso.
- Probar tiempos de contacto mayores a 24 horas en superficies de acero inoxidable con el detergente biodegradable para analizar si el porcentaje de prevención de la adherencia es directamente proporcional al tiempo de contacto.
- Realizar pruebas de la eliminación de la adherencia de microorganismos con biopelículas formadas por más 192 horas para evaluar si el tiempo de formación de la biopelícula tiene efecto sobre la efectividad del detergente.

# BIBLIOGRAFÍA

- Código de Regulaciones Federales (ECFR). (2019). Regulaciones federales. Título 21 Alimentos y drogas. Capítulo I: Administración de alimentos y drogas departamento de salud y servicios humanos. Subcapítulo B: Sustancias utilizadas para controlar el crecimiento de microorganismos. Parte 178 -Aditivos alimentarios indirectos: ajuvantes, producción de sida y desinfectantes. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=178.10> 10 (abril de 2019).
- Deleu, M., Bouffieux, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Thonart, P., Brasseur, R. (2003). Interaction of surfactin with membranes: A computational approach. *Langmuir*, 19(8), 3377–3385.
- Ercilla, S. B. de, & Muñoz, C. G. (2003). *Física general*. 288.
- Fratamico, P. M., Annous, B. A., & Gunther, N. W. (2009). *Biofilms in the food and beverage industries Related titles* : (January 2019), 580.
- Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., & Holah, J. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 41–48.
- Giovanni, R., & Hugo, V. (2012). *DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA ( CL 50 ) DE CUATRO DETERGENTES DOMÉSTICOS BIODEGRADABLES EN *Laonereis culveri* ( WEBSTER 1879 ) ( POLYCHAETA : ANNELIDA )* Russell Giovanni UC-PERAZA \* y Víctor Hugo DELGADO-BLAS Laboratorio de Suelos , Divisi.
- INEN. (2006) NTE INEN 1529-5:2006 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. REP
- INEN. (1982) NTE INEN 0848: 1982 Agentes tensioactivos. Detergente líquido para usos especiales. Requisitos
- Jemil, N., ben Ayed, H., Manresa, A., Nasri, M., & Hmidet, N. (2017). Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from

- Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1050-2>
- Jurado Alameda, E., Altmajer Vaz, D., García Román, M., & Siqueira Curto Valle, R. de C. (2016). Cleaning of Starchy Soils in Clean-in-Place (CIP) Systems: Relationship Between Contact Angle and Detergency. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37(3), 317–325.  
<https://doi.org/10.1080/01932691.2014.1003223>
- Mukherjee, A. K. (2007). Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 330–335. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02197.x>
- Nitschke, M., Araújo, L., Costa, S., Pires, R., Zeraik, A., Fernandes, A., Contiero, J. (2009). Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 3-4.
- Nitschke, M., & Silva, S. S. e. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 631–638.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>
- Paraszkiwicz, K., Moryl, M., Płaza, G., Bhagat, D., K. Satpute, S., & Bernat, P. (2019). Surfactants of microbial origin as antibiofilm agents. *International Journal of Environmental Health Research*, 00(00), 1–20.  
<https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1664729>
- Peng, J. sen, Tsai, W. C., & Chou, C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1–2), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00517-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00517-1)
- Perilla, M., Ajello, G., Bopp, C., Elliott, J., Facklam, R., Knapp, J., Dowell, S. (2003). Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Atlanta: WHO/CDS/CSR/RMD.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062.

- Rivera, D., & Sandoval, A. (2017). *Implementación de un sistema de limpieza en la línea de embutidos de la planta piloto de ESPOL*. Tesis de Ingeniería publicada. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Takahashi, T., Ohno, O., Ikeda, Y., Sawa, R., Homma, Y., Igarashi, M., & Umezawa, K. (2006). Inhibition of lipopolysaccharide activity by a bacterial cyclic lipopeptide surfactin. *Journal of Antibiotics*, 59(1), 35–43. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.6>
- Thomas, A., & Sathian, C. T. (2014). Cleaning-In-Place (CIP) System in Dairy Plant-Review. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(6), 41–44. <https://doi.org/10.9790/2402-08634144>

# APÉNDICES

## Apéndice 1. Detalle de Resultados Microbiológicos

Resultados del recuento microbiano para la prevención de la adherencia de los microorganismos en placas de acero inoxidable 316, en UFC/cm<sup>2</sup>, después del tratamiento con 2% p/v de las fórmulas del detergente biodegradable (F) y los blancos de cada fórmula (CF)

Bacterias	Fórmulas											
	F1	CF1	F2	CF2	F3	CF3	F4	CF4	F5	CF5	F6	CF6
	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	3.2 x 10 <sup>5</sup>	3.5 x 10 <sup>5</sup>	>3.0x10 <sup>8</sup>	>3.0x10 <sup>8</sup>	1.7 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	5.8 x 10 <sup>3</sup>	7.3 x 10 <sup>3</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.6 x 10 <sup>7</sup>
<i>B. cereus</i>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	>3.0 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	3.8 x 10 <sup>5</sup>	9.0 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>

Fuente: elaboración propia

Resultados del recuento microbiano para la prevención de la adherencia de microorganismos en placas de acero inoxidable 316, en UFC/cm<sup>2</sup>, después del tratamiento con 2% p/v de la fórmula base

Bacterias	Fórmula	
	FB	Control
	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	2.2 x 10 <sup>3</sup>	8.0 x 10 <sup>3</sup>
<i>B. cereus</i>	3.5 x 10 <sup>3</sup>	6.0 x 10 <sup>3</sup>

Fuente: elaboración propia

**Resultados del recuento microbiano para la prevención de la adherencia de microorganismos en placas de acero inoxidable 316, en UFC/cm<sup>2</sup>, después del tratamiento con 5% p/v de la fórmula 1 y la fórmula base**

Bacterias	F1	Control F1	FB	Control FB
	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	1.1 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	5.8 x 10 <sup>3</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>
<i>B. cereus</i>	1.6 x 10 <sup>3</sup>	5.0 x 10 <sup>5</sup>	1.7 x 10 <sup>5</sup>	3.9 x 10 <sup>5</sup>

Fuente: elaboración propia

**Resultados del recuento microbiano para la eliminación de la adherencia de microorganismos en superficies de acero inoxidable 316, en UFC/cm<sup>2</sup>, a las 192 h de formación de biopelícula, después del tratamiento con la solución del detergente fórmula 1 y fórmula base al 5% p/v y control**

Bacterias	F1	Control F1	FB	Control FB
	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	2.0 x 10 <sup>4</sup>	>3.0 x 10 <sup>6</sup>	3.5 x 10 <sup>3</sup>	>3.0 x 10 <sup>6</sup>
<i>B. cereus</i>	<1.0 x 10 <sup>2</sup>	2.5 x 10 <sup>4</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>	2.5 x 10 <sup>4</sup>

Fuente: elaboración propia

**Recuento del número de células de microorganismos adheridos a la superficie de acero inoxidable 316, en UFC/cm<sup>2</sup>, a las 192 h de formación de biopelícula**

Biopelículas	
<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
1.6 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>7</sup>

Fuente: elaboración propia



## Apéndice 2. Reducción logarítmica microbiana

### Reducción logarítmica microbiana en prueba de prevención de la adherencia de microorganismos al 2%

Bacterias	Reducción logarítmica log UFC/cm <sup>2</sup>						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	FB
<i>E. coli</i>	0.04	0.00	0.00	0.10	0.06	1.03	0.56
<i>B. cereus</i>	1.40	0.47	0.16	0.22	0.00	0.00	0.23

Fuente: elaboración propia

### Reducción logarítmica microbiana en prueba de prevención de la adherencia de microorganismos al 5%

Bacterias	Reducción logarítmica F1	Reducción logarítmica FB
	log UFC/cm <sup>2</sup>	log UFC/cm <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	0.04	1.62
<i>B. cereus</i>	2.49	0.35

Fuente: elaboración propia

**Apéndices 3. Costos directos, costos indirectos, costos de suministros, gastos administrativos y gastos de ventas**

**Costos directos**

**Costo de materia prima por kilo – detergente alcalino biodegradable**

<b>Detergente biodegradable</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Costo del producto</b>
Agua desmineralizada	\$0.01
Soda líquida al 50%	\$0.11
Gluconato de sodio	\$0.08
Tripolifosfato de sodio	\$0.01
Color caramelo líquido	\$0.000011
Tensioactivo microbiano	\$0.000072
<b>Envase</b>	<b>Costo del envase</b>
Bidón	\$1.00
<b>Costo total del producto</b>	<b>\$1.21</b>

Fuente: Elaboración propia

**Costo de materia prima por kilo – detergente alcalino**

<b>Detergente alcalino</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Costo del producto</b>
Agua desmineralizada	\$0.01
Soda líquida al 50%	\$0.19
Gluconato de sodio	\$0.08
Fosfato trisodium	\$0.01
Color caramelo líquido	\$0.000011
Envase (Bidón)	\$1.00
<b>Costo total del producto</b>	<b>\$1.29</b>

Fuente: Elaboración propia

### Costo de mano de obra directa

Costos de mano de obra directa				
Concepto	Pago por colaborador	Cantidad de obreros	Valor mensual	Valor anual
Obreros	\$400.00	3	\$1,200.00	\$14,400.00
<b>TOTAL</b>				<b>\$14,400.00</b>

Fuente: Elaboración propia

### Costos indirectos

#### Costo de mano de obra indirecta

Costos de mano de obra indirecta				
Concepto	Pago por colaborador	Cantidad de obreros	Valor mensual	Valor anual
Jefe de Producción/Calidad	\$400.00	1	\$400.00	\$4,800.00
<b>TOTAL</b>				<b>\$4,800.00</b>

Fuente: Elaboración propia

### Costo de suministros

Suministros de Producción				
Suministros	Cantidad	Unidad	Valor unitario	Valor anual
Energía Eléctrica	20500	Kwh	\$0.05	\$1,025.00
Agua	35000	L	\$0.22	\$7,700.00
<b>Total</b>				<b>\$8,725.00</b>
Otros suministros				
Otros suministros	Cantidad	Unidad	Valor unitario	Valor anual
Botiquín	1	Unidad	\$12.53	\$150.36
Cofias	2	Paquete	\$5.50	\$132.00
Guantes	1	Paquete	\$9.00	\$84.00
<b>Total</b>				<b>\$366.36</b>
Suministros de Fabricación				
Denominación				Valor total
Suministros de producción				\$8,725.00
Otros suministros				\$366.36
<b>TOTAL</b>				<b>\$9,091.36</b>

Fuente: Elaboración propia

### Gastos administrativos

<b>Sueldos al personal administrativo</b>				
<b>Concepto</b>	<b>Pago por colaborador</b>	<b>Cantidad de obreros</b>	<b>Valor mensual</b>	<b>Valor anual</b>
Gerente General	\$900.00	1	\$900.00	\$10,800.00
<b>TOTAL</b>				<b>\$10,800.00</b>
<b>Gastos generales</b>				
<b>Activos</b>	<b>Costos</b>	<b>Vida útil (años)</b>	<b>Valor a depreciar</b>	<b>Depreciación anual</b>
Servicios de contaduría	\$90.00	-	-	\$1,080.00
Suministros de oficina	\$25.00	-	-	\$300.00
<b>Total</b>				<b>\$1,380.00</b>
<b>Gastos Administrativos</b>				
<b>Descripción</b>				<b>Valor Total</b>
Sueldos al personal administrativo				\$10,800.00
Gastos generales				\$1,380.00
<b>TOTAL</b>				<b>\$12,180.00</b>

Fuente: Elaboración propia

### Gastos de ventas

<b>Sueldos al personal de ventas</b>				
<b>Concepto</b>	<b>Pago por colaborador</b>	<b>Cantidad de obreros</b>	<b>Valor mensual</b>	<b>Valor anual</b>
Transporte	\$100.00	1	\$100.00	\$1,200.00
<b>TOTAL</b>				<b>\$1,200.00</b>

Fuente: Elaboración propia