

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD JUÁREZ**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES COMO  
BIOCONSERVADORES, A TRAVÉS DE LA TEORÍA DE  
CONFIABILIDAD**

**TESIS DOCTORAL  
QUE PRESENTA:**

**INOCENTE YULIANA MELÉNDEZ PASTRANA**

**COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**CD. JUÁREZ, CHIH.**

**SEPTIEMBRE, 2021.**



Ciudad Juárez, Chihuahua, **25/agosto/2021**

Oficio N°: D.E.P.I/007

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. INOCENTE YULIANA MELÉNDEZ PASTRANA  
CANDIDATO (A) AL GRADO DE DOCTOR (A) EN  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
P R E S E N T E.**

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de Tesis titulado **"ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES COMO BIOCONSERVADORES, A TRAVÉS DE LA TEORÍA DE CONFIABILIDAD"** ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación, que está de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior se le autoriza se proceda con la **impresión definitiva de su trabajo de Tesis.**

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*

**C. EDUARDO RAFAEL POBLANO OJINAGA  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



ccp. Departamento de Servicios escolares  
División de Estudios Profesionales

ERPO/dmisp





**C. EDUARDO RAFAÉL POBLANO OJINAGA  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PRESENTE.**

Por medio de la presente se hace constar que la Tesis denominada **“ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES COMO BIOCONSERVADORES, A TRAVÉS DE LA TEORÍA DE CONFIABILIDAD”**, que presenta el (la) alumno (a) **C. INOCENTE YULIANA MELÉNDEZ PASTRANA**, con número de control **D98090563**, para obtener el Grado de Doctor (a) en Ciencias de la Ingeniería, ha sido revisada y aprobada en su forma y contenido por los suscritos, por lo que no existe ningún inconveniente para la impresión de la misma.

Se extiende la presente constancia a petición de la interesada y para los fines legales que a ella misma convengan, en Ciudad Juárez, Chihuahua, a los dieciséis días del mes de agosto del año dos mil veintiuno.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*

**C. MANUEL ALONSO RODRÍGUEZ MORACHIS  
DIRECTOR**

**C. MANUEL ARNOLDO RODRÍGUEZ MEDINA  
CO-DIRECTOR**

**C. ALFONSO ALDAPE ALAMILLO  
REVISOR**

**C. ROSA MARÍA REYES MARTÍNEZ  
REVISORA**

**C. LUIS ALBERTO RODRÍGUEZ PICÓN  
REVISOR EXTERNO**

ccp. Coordinación de Apoyo a la Titulación  
Alumno (a)



## **DEDICATORIA**

A mi madre, por ser el principal motor de mis sueños, gracias por confiar y creer en mí. Tus oraciones a lo largo de mi vida me protegen y me llevan por el camino del bien. ¡Te amo madre mía!

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, que en todo momento está conmigo ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía el destino de vida.

Con amor a mi Madre y a mi Padre por su gran sentido de responsabilidad y lucha ante la vida.

A mi director de tesis; Dr. Manuel Alonso Rodríguez Morachis, por su disposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas, por sus substanciales sugerencias durante la realización de esta investigación y por compartir su conocimiento conmigo, gracias.

Gracias, al comité revisor integrado por el Dr. Manuel A. Rodríguez Medina, Dr. Alfonso Aldape Alamillo, Dra. Rosa M. Reyes y Dr. Luis A. Rodríguez Picón, por el apoyo, consejos y críticas pertinentes que me brindaron para mejorar esta investigación. Al Dr. Adán T. Morales Vargas por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto.

A la Universidad Tecnológica de Ciudad Juárez, por todo el apoyo recibido por parte de los directivos, gracias por darme esta oportunidad.

Y a todos los que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta investigación y en mi formación profesional gracias....

*Yuliana Meléndez Pastrana.*

## RESUMEN

La calidad y la confiabilidad son componentes importantes del crecimiento y la competitividad de las empresas. La industria de alimentos procesados se encuentra en una continua actualización de sus productos e inevitablemente, se ha envuelto en la dinámica de determinar la vida útil de ellos, ya que una fecha mal estimada implica pérdidas económicas, tanto para el productor como el consumidor. La tortilla de maíz es uno de los principales componentes en la dieta del pueblo mexicano, es un producto perecedero y la principal causa de descomposición es el crecimiento de hongos. En el proceso de elaboración de tortillas de maíz se emplean diferentes conservadores químicos, como el propionato de sodio y algunos acidificantes para incrementar la vida de anaquel de la tortilla de maíz. La Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, no marca un límite máximo en la adición de propionato de sodio en tortilla de maíz nixtamalizada, sólo se basa en las buenas prácticas de fabricación (BPF). Al no tener una regulación bien definida sobre la adición de conservadores químicos, no existe protección para el consumidor. De aquí que esta investigación propone la adición de aceite esenciales de tomillo, te de limón y clavo de olor como bioconservadores.

El contenido de este trabajo se divide en seis capítulos los cuales fueron seleccionados de acuerdo a las necesidades del mismo. El primer capítulo inicia con una introducción explicando la problemática que lleva el consumir alimentos procesados y sus consecuencias, así como breve explicación sobre cómo se pretende resolver la problemática.

El capítulo dos aborda el planteamiento del problema, se inicia con una explicación sobre la industria de alimentos, la tortilla de maíz en México, el uso de conservadores químicos y sus aspectos legales. Se documenta información sobre los bioconservadores y el uso de aceite esenciales.

El capítulo tres contiene información teórica necesaria para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo, inicia con una explicación sobre degradación, algunos conceptos básicos de supervivencia, su clasificación, métodos paramétricos y no paramétricos.

En el capítulo cuatro se describe los materiales y métodos necesarios para el desarrollo de esta investigación, así como el diseño experimental aplicado en la evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Esta investigación documenta los resultados de la experimentación en el capítulo cinco, entre lo que se destaca la evaluación *in vitro*, donde se determine la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los aceites esenciales, para realizar las pruebas de estrés en tortilla de maíz analizando diferentes relaciones vida-esfuerzo, tomando como base la relación de Arrhenius para comprobar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de ciertos fenómenos químicos en la tortilla de maíz.

El capítulo seis contiene las conclusiones obtenidas del resultado de la relación temperatura con respecto a la descomposición de la tortilla de maíz y la relación temperatura-humedad con respecto a la degradación de la tortilla de maíz.

## CONTENIDO

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vi</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Antecedentes .....	3
2.1.1. La Industria de Alimentos Procesados en México.....	3
2.1.2. Harina de Maíz.....	4
2.1.3. Alimentos Procesados.....	5
2.1.4. Aditivos.....	6
2.1.5. Aditivos en Tortillas de Maíz .....	8
2.1.5.1. Ácido Sórbico .....	12
2.1.5.2. Sorbato de Potasio.....	12
2.1.5.3. Ácido Benzoico.....	12
2.1.5.4. Benzoato de Sodio .....	13
2.1.5.5. Ácido Acético.....	13
2.1.5.6. Propionato de Sodio.....	13
2.1.5.7. Propionato de Calcio .....	14
2.1.5.8. Sorbato de Potasio.....	14
2.1.6. Justificación del Uso de Aditivos .....	14
2.1.7. Toxicidad.....	15
2.1.8. Aspectos Legales.....	16
2.1.9. Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).....	19
2.1.10. Bioconservadores .....	19

2.1.11. Aceites Esenciales .....	19
2.1.11.1. Clavo de Olor .....	20
2.1.11.2. Tomillo.....	21
2.1.11.3. <i>Lemon Grass</i> (Hierba Limón) .....	22
2.1.12. Aflatoxinas.....	22
2.1.13. <i>Aspergillus Flavus</i> .....	24
2.1.14. Vida Útil de un Alimento .....	25
2.2. Descripción del Problema .....	27
2.3. Preguntas de Investigación.....	27
2.4 Hipótesis .....	28
2.5. Objetivos .....	28
2.5.1. Objetivo General .....	28
2.5.2. Objetivos Particulares .....	28
2.6. Justificación.....	29
2.7 Delimitaciones.....	30
<b>3. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>31</b>
3.1. Degradación.....	31
3.1.1. Conceptos Básicos de Análisis de Supervivencia .....	33
3.1.1.1. Datos Censurados.....	34
3.2. Funciones de Confiabilidad .....	36
3.2.1. Probabilidades a Analizar.....	39
3.3. Función Acumulada de Falla.....	39
3.4. Métodos No Paramétricos.....	40
3.5. Métodos Paramétricos .....	45
3.5.1. Relación Vida Esfuerzo .....	49
3.5.2. Linealización de la Funciones de Confiabilidad.....	50
3.5.3. Distribución Exponencial.....	50
3.5.4. Distribución Weibull.....	52
3.5.5. Distribución Lognormal.....	53

3.5.6. Distribución Beta Generalizada.....	54
3.5.7. Distribución Gamma.....	55
3.5.8. Método Kaplan-Meier.....	57
3.5.9. Logrank <i>Test</i> .....	57
3.5.10. Modelo de Riesgos Proporcionales (Regresión de Cox).....	57
3.5.10.1. Estimación.....	59
3.6. Ajuste de los Modelos de Regresión.....	66
3.6.1. Relación Vida Esfuerzo Arrhenius.....	67
3.6.1.1. Modelo Arrhenius-Exponencial.....	68
3.6.1.2. Modelo Arrhenius-Weibull .....	69
3.6.1.3. Modelo Arrhenius-Lognormal .....	70
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
4.1. Material, Equipo y Reactivos.....	73
4.2. Métodos .....	74
4.2.1. Preparación del Inóculo.....	74
4.2.2. Preparación del PDA.....	75
4.2.3. Preparación de PDA con Aceites Esenciales en Concentraciones de 2%, 1% y 0.5% y Crecimiento Radial .....	75
4.2.4. Concentraciones Utilizadas en el Experimento .....	76
4.3. Evaluación <i>In vitro</i> .....	77
4.4. Evaluación en Tortilla de Maíz .....	77
4.5. Determinación de los Niveles Óptimos para la Concentración de Aceite Esencial de Tomillo en Tortilla de Maíz.....	78
4.6. Dependencia de la Temperatura.....	79
4.7. Dependencia de la Temperatura-Humedad .....	79
4.8. Modelo de Riesgo Proporcional de Cox.....	80
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>82</b>
5.1. Experimento General .....	82

5.2. Primer Experimento para el Clavo de Olor .....	83
5.3. Primer Experimento para la Hierba Limón .....	88
5.4. Primer Experimento para el Tomillo .....	93
5.5. Evaluación <i>In vitro</i> .....	98
5.6. Determinación de los Niveles Óptimos para la Concentración del Tomillo.....	101
5.7. Dependencia de la Temperatura.....	105
5.7.1. Ajuste del Modelo de Regresión .....	111
5.7.2. Modelo Arrhenius-Weibull .....	112
5.7.3. Modelo Arrhenius-Lognormal .....	115
5.7.4. Estimación de los Tiempos de Fallo.....	118
5.8. Relación Temperatura-Humedad.....	119
5.8.1. Modelo T-H-Weibull.....	125
5.9. Modelo de Riesgo Proporcional de Cox.....	129
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>135</b>
6.1. Respuestas a las Preguntas de Investigación.....	135
6.2. Análisis de las Hipótesis de Investigación.....	136
6.3. Verificación del Objetivo de la Investigación .....	138
6.4. Conclusiones.....	139
6.5. Ventajas y Desventajas del Modelo Propuesto .....	143
6.5.1. Ventajas del Modelo Propuesto .....	143
6.5.2. Desventajas del Modelo Propuesto.....	144
6.6. Recomendaciones .....	144
6.6.1. Futuras Investigaciones Sugeridas .....	145
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>155</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Aditivos Usados en Tortilla de Maíz Nixtamalizada.....	9
Tabla 2.2. Algunas Propiedades del Clavo de Olor .....	20
Tabla 2.3. Clasificación de Micotoxinas de Acuerdo al Riesgo que Representa para la Salud.....	23
Tabla 2.4. Especificaciones de Aflatoxinas (NOM-187-SSA1/SCFI-2002).....	24
Tabla 2.5. Vida Útil de Almacenamiento de Tejidos Vegetales y Animales .....	26
Tabla 3.1. Tabla de Doble Entrada .....	44
Tabla 4.1. Cantidad de Aceite a Diferentes Concentraciones .....	75
Tabla 4.2. Cantidad de Aceite Usado en Diferentes Pruebas .....	76
Tabla 4.3. Diseño de Superficie de Respuesta para Tortillas .....	78
Tabla 4.4. Cuadrado Latino para Tortilla de Maíz .....	81
Tabla 5.1. Análisis de Varianza, Experimento General .....	83
Tabla 5.2. Áreas de Crecimiento de $\text{cm}^2$ para el Clavo de Olor a Diferentes Concentraciones .....	83
Tabla 5.3. ANOVA, Modelo Lineal General para los Rangos de las Áreas de Crecimiento con Aceite Esencial de Clavo de Olor .....	84
Tabla 5.4. ANOVA, Modelo Lineal General Aceite Esencial de Clavo de Olor .....	85
Tabla 5.5. Áreas de Crecimiento de $\text{cm}^2$ para la Hierba Limón a Diferentes Concentraciones .....	88
Tabla 5.6. ANOVA, Modelo Lineal General Aceite Esencial de Hierba Limón .....	89
Tabla 5.7. Áreas de Crecimiento de $\text{cm}^2$ para el Tomillo a Diferentes Concentraciones .....	93
Tabla 5.8. ANOVA, Modelo Lineal General Aceite Esencial de Hierba Limón .....	94
Tabla 5.9. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de Aceites Esenciales.....	98

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla 5.10. Porcentajes de Inhibición de los Diferentes Aceites Esenciales a Diferentes Concentraciones.....	99
Tabla 5.11. Datos de Vida Para Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo de Diferentes Concentraciones y a Diferentes Tiempos de Empaque.....	101
Tabla 5.12. Análisis de Varianza, Vida de Tortilla Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo .....	103
Tabla 5.13. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Estresada a Diferentes Temperaturas.....	106
Tabla 5.14. Análisis de Varianza de un Solo Factor para Tortillas de Maíz Estresada a Diferentes Temperaturas.....	107
Tabla 5.15. Dependencia de la Temperatura.....	108
Tabla 5.16. Predicción del Tiempo de Vida Útil de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09% y Tortilla de Maíz Adicionada con Propionato de Sodio al 0.2%.....	111
Tabla 5.17. Criterio AIC.....	111
Tabla 5.18. $f(t)$ , $F(t)$ y $R(t)$ , a Diferentes Temperaturas para la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09%.....	115
Tabla 5.19. Estimación de los Parámetros con Intervalos de 95% de Confianza .....	117
Tabla 5.20. Estimación de los Tiempos de Fallo con Intervalos de Confianza del 95% .....	118
Tabla 5.21. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Estresada a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque .....	120

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla 5.22. ANOVA, Modelo Lineal General Para Tortillas de Maíz Estresada a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque.....	121
Tabla 5.23. Predicción del Tiempo de Vida Útil de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09% y Tortilla de Maíz Adicionada con Propionato de Sodio al 0.2% a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque.....	124
Tabla 5.24. $f(t)$ , $F(t)$ y $R(t)$ , a Diferentes Temperaturas y diferentes tiempos de empaque para la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09%.....	128
Tabla 5.25. Análisis de Varianza para Tortillas de Maíz (Temperatura, Humedad y pH) .....	130
Tabla 5.26. Resultados del Modelo de Riesgos Proporcionales de Cox.....	131

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Producción Mexicana de Alimentos Procesados por Industria en 2016, % participación .....	4
Figura 2.2. Clasificación de Aditivos Alimentarios.....	7
Figura 2.3. Clavo de Olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> ).....	21
Figura 2.4. Hierba Limón ( <i>Cymbopogon Citratus</i> ).....	22
Figura 2.5. <i>Aspergillus Flavus</i> .....	25
Figura 3.1. Censura por la Derecha.....	36
Figura 3.2. Censura por la Izquierda.....	36
Figura 3.3. Gráfica de Función de Confiabilidad .....	38
Figura 3.4. Estimación de la Función de Supervivencia.....	43
Figura 5.1. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Clavo de Olor Contra el Tiempo .....	86
Figura 5.2. Gráfica de Efectos Principales Clavo de Olor .....	87
Figura 5.3. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Hierba Limón Contra el Tiempo .....	90
Figura 5.4. Gráfica de Residuos para la Hierba Limón .....	92
Figura 5.5. Gráfica de Efectos Principales Para la Hierba Limón. ....	92
Figura 5.6. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Tomillo Contra el Tiempo.....	95
Figura 5.7. Gráfica de Residuos para el Tomillo.....	97
Figura 5.8. Gráfica de Efectos Principales para el Tomillo.....	97
Figura 5.9. Gráficas de Dispersión del Porcentaje de Inhibición de los Diferentes Aceites .....	100
Figura 5.10. Gráfica de Residuos Para la Vida de Tortilla Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo .....	102
Figura 5.11. Superficie de Respuesta de la Vida en Horas contra Concentración y Tiempo de Empaque .....	104

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura 5.12. Gráfica de Contorno de la Vida en Horas contra Concentración y Tiempo de Empaque.....	104
Figura 5.13. Optimizador de Respuesta.....	105
Figura 5.14. Gráfica de Residuos Para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09%.....	106
Figura 5.15. Gráfico del $\ln(k)$ en Función de $1/T$ .....	109
Figura 5.16. Gráfica de Revisión General de Distribución Para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite esencial de Tomillo al 0.09%, Estresada a Diferentes Temperaturas.....	113
Figura 5.17. Relación entre Temperatura y Tiempos de Falla .....	116
Figura 5.18. Extrapolación de Tiempos de Fallo Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo .....	119
Figura 5.19. Prueba de Igualdad de Varianzas, Vida contra Temperatura .....	122
Figura 5.20. Prueba de Igualdad de Varianzas, Vida contra Humedad .....	122
Figura 5.21. Gráfica de Revisión General de Distribución para la Vida en horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de de Tomillo al 0.09%, Estresada a Diferentes Temperaturas y diferentes Tiempo de Empaque. ....	126
Figura 5.22. Gráfica de Probabilidad para Vida en Horas de la Tortilla de Maíz .....	129
Figura 5.23. Covariantes que Afectan a la Tortilla de Maíz.....	132
Figura 5.24. Curva de Supervivencia Global Ajustada por los Cofactores.....	133
Figura 5.25. Curva de Supervivencia por Temperatura .....	134

## 1. INTRODUCCIÓN

Se vive en un mundo donde cada vez el desarrollo industrial va tomando más auge, el empleo de nuevas tecnologías conduce a una vida simplificada y rápida, donde el tiempo de duración de las cosas puede haber quedado en segundo plano, sin embargo, conocer el tiempo que durarán los alimentos ha cobrado gran importancia. De aquí que el evitar el deterioro de los productos alimenticios, tanto por la calidad como por la salud, lleva a tomar precauciones para minimizar riesgos de contraer enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados, o alimentos procesados.

La mayor parte de alimentos que consumimos día a día son tratados con aditivos, conservadores y otras sustancias químicas con el fin de mantener en buen estado y por más tiempo los alimentos. En la etiqueta de un producto se encuentra la fecha de caducidad o la fecha de consumo preferente, ambas fechas indican el fin de la vida útil del alimento, donde los consumidores pueden conocer la vida útil del alimento adquirido. Según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 (Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria) en su apartado tres define como:

- a) Fecha de Caducidad: Fecha límite en que se considera que las características sanitarias y de calidad que debe reunir para su consumo un producto preenvasado, almacenado en las condiciones sugeridas por el responsable del producto, se reducen o eliminan de tal manera que después de esta fecha no debe comercializarse o consumirse.
- b) Fecha de Consumo Preferente: Fecha en que, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, expira el periodo durante el cual el producto preenvasado es comercializable y mantiene las cualidades específicas que se le atribuyen tácita o explícitamente, pero después de la cual el producto preenvasado puede ser consumido.

Hoy en día, la población está interesada en consumir alimentos libres de aditivos químicos, con un valor nutricional elevado y que represente una alternativa en la prevención de enfermedades. En esta propuesta de investigación, se desea analizar, a través de Ingeniería de Confiabilidad, el tiempo de vida de la tortilla de maíz, adicionada con aceite esencial de Clavo de olor, aceite esencial de Tomillo y aceite esencial de *Lemon Grass* (Hierba Limón) como bioconservadores, de manera que se puedan contrastar los efectos de inhibición en el crecimiento de hongos de cada uno de los bioconservadores antes mencionados y comparar su eficiencia con un conservador químico.

La industria de alimentos procesados se encuentra en una continua actualización de nuevos productos e inevitablemente, se ha envuelto en la dinámica de determinar la vida útil, fecha de consumo preferente, de caducidad, etcétera, de sus productos, ya que una fecha mal estimada implica mermas o pérdidas monetarias.

Los tiempos de falla o vida de alimentos o productos se pueden estimar por medio de pruebas de confiabilidad completas, con el fin de provocar la falla y determinar las causas de falla para efectuar modificaciones al diseño, determinar la confiabilidad de las partes del diseño, establecer tiempos de garantía, etcétera. Las pruebas de vida acelerada son diseñadas para comprobar si los productos pueden cumplir con los requerimientos establecidos por el cliente desde el punto de vista de su confiabilidad para realizar su función de diseño.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En esta sección se proporciona una breve reseña de las razones existentes por las que se desea realizar esta investigación, se muestra el planteamiento del problema que se intenta resolver, bajo qué supuestos se trabajará, qué preguntas guiarán la investigación, los objetivos que se buscan, las delimitaciones bajo las cuales se pretende trabajar y las hipótesis que se desean comprobar.

### **2.1. Antecedentes.**

La actividad manufacturera en México está compuesta por nueve ramas económicas: alimentos, bebidas y tabaco; textiles, vestido y cuero; madera y sus productos; imprenta y editoriales; químicos, derivados del petróleo, caucho y plásticos; minerales no metálicos, excepto derivados del petróleo; industrias metálicas básicas; productos metálicos, maquinaria y equipo, entre otras industrias manufactureras. La industria de alimentos destaca, por su importante estrategia, pues se encarga de suministrar éstos a una población creciente, permitiendo conservar desde que se obtienen hasta que se consumen, manteniendo excedentes y agregando valor al producto, satisfaciendo nuevas necesidades de consumo (Castañón y Solleiro, 2003).

#### **2.1.1. La Industria de Alimentos Procesados en México.**

En el 2016, en México la industria de alimentos procesados alcanzó un valor de producción de 111.4 miles de millones de dolares y se espera que éste crezca a una tasa media de crecimiento anual del 5 % en el periodo 2017-2021 (ProMéxico, 2018). El 54% de la producción por industria se concentró en las categorías de panadería-tortilla y procesamiento de carnes, como se muestra en la figura 2.1.

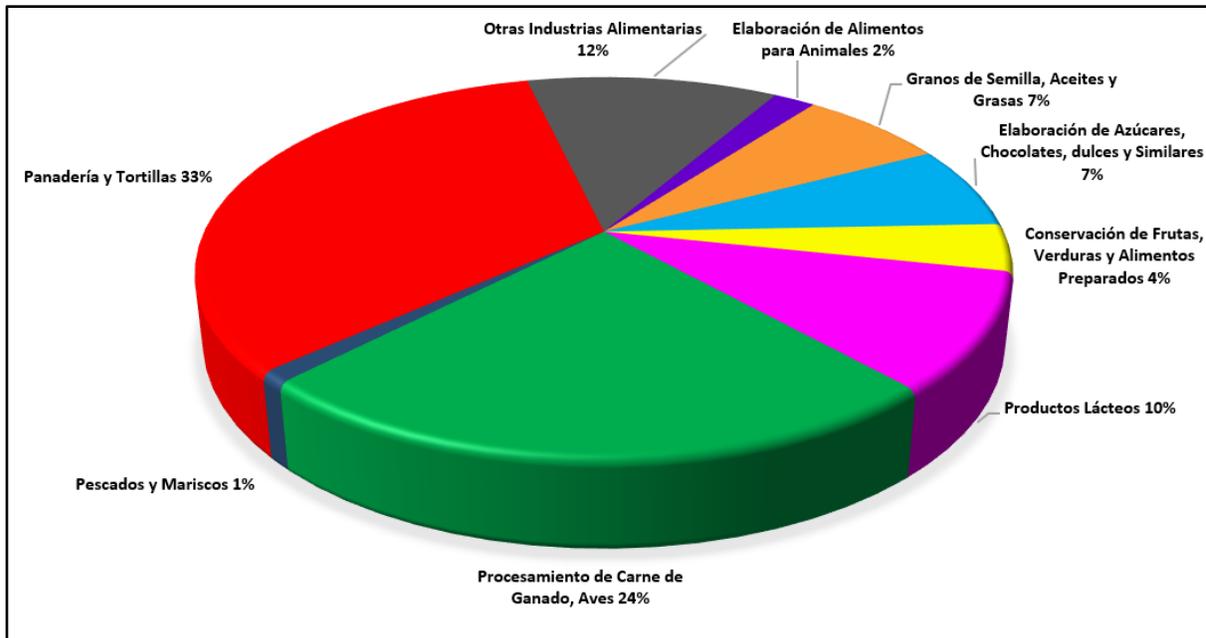


Figura 2.1. Producción Mexicana de Alimentos Procesados por Industria en 2016, % participación.

La Secretaría de Economía declara que el mayor valor agregado de producción recae en la elaboración de productos de panadería y tortillas con un 33%. En el caso de la industria de la harina maíz, tortilla, se comercializa estos productos en más de 120 países. Lo anterior, derivado de que la industria cuenta con un recurso humano altamente especializado, que ha fortalecido su capacidad innovadora para desarrollar productos saludables de alta calidad para satisfacer la demanda de sus clientes y consumidores en los mercados donde participa.

### 2.1.2. Harina de Maíz.

El maíz se consume principalmente en forma procesada y el principal producto es la tortilla, que es el componente más importante de la alimentación de la población mexicana. Según datos proporcionados por SIAP-SAGARPA (2015), se consumen alrededor de 12.3 millones de toneladas de maíz en forma de tortilla, de las cuales el 64 % se elaboran a través del método tradicional de maíz-masa-tortilla y el 36 % a través de la industria harinera.

En las formas de elaboración de la tortilla se identifican tres sistemas: el milenario-artesanal, el de tortillerías mecanizadas y el industrial de tortilla fría envasada. El primero es el que prevalece principalmente en las familias del medio rural que elaboran su propia tortilla, las cuales realizan el nixtamalizado del grano de maíz, posteriormente se procede a la molienda con un metate de piedra o con molino mecánico, de la molienda se obtiene la masa con la que elaborarán las tortillas (Vázquez et al. 2011).

El sistema de tortillerías mecanizadas es el que abastece a la mayoría de la población y se caracteriza por utilizar máquinas que integran la elaboración de la tortilla y su cocimiento. La masa se elabora con maíz nixtamalizado y molido de forma similar al del sistema milenario antes mencionado o también se hace a partir de harina de maíz.

El sistema industrial de tortilla fría envasada se desarrolla en plantas de tipo industrial en donde se producen grandes volúmenes de tortilla, utilizan predominantemente harina de maíz y envasan su producto para ser distribuido.

La tortilla obtenida tiene cualidades muy distintas a las obtenidas por los otros sistemas y en general, se puede decir que es el sistema que menos calidad presenta con respecto al sistema artesanal. Por su costo de distribución, el producto tiene un precio más elevado que el de la tortilla caliente, razón que aunada a la de su calidad, lo hacen el de menor consumo, aun cuando tiene la ventaja de estar disponible en la mayoría de los establecimientos comerciales (Gutiérrez et al. 2007).

### **2.1.3. Alimentos Procesados.**

Cerca del 58% de las calorías consumidas en la dieta de los mexicanos están conformadas por alimentos y bebidas empaquetadas (Popkin, 2014). La industria alimentaria, como parte de su desarrollo ha incluido el procesamiento de los alimentos con el objetivo de facilitar su producción, distribución y expendio (Floros et al. 2010). El procesamiento de alimentos implica procesos físicos, biológicos y químicos utilizados después de que los alimentos se separan de la naturaleza y antes de ser consumidos. De acuerdo al modelo de perfil de nutrientes de la Organización Panamericana de la

Salud (OPS), la tendencia a consumir alimentos procesados y productos ultraprocesados (PUP) está incrementada en Latinoamérica. De acuerdo a la OPS (Organización Panamericana de la Salud, 2016), los productos alimenticios procesados provienen de la elaboración industrial, en la cual se añade sal, azúcar, conservadores u otros ingredientes culinarios a alimentos sin procesar o mínimamente procesados a fin de preservarlos o darles un sabor más agradable. Estos derivan directamente de alimentos naturales y se reconocen como una versión de los alimentos originales. Por el contrario, los PUP se definen como productos listos para consumir que se componen de sustancias extraídas de los alimentos (aceites, grasas, azúcar y proteínas), derivados de constituyentes de los alimentos (grasas hidrogenadas, almidones modificados) o sintetizados de materiales orgánicos (aromatizantes, potenciadores del sabor y otros aditivos utilizados para alterar las propiedades sensoriales del alimento) (Moubarac et al. 2014).

#### **2.1.4. Aditivos.**

La Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, define como aditivos para alimentos, a las sustancias que se adicionan directamente a los productos, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación, entre otras funciones. En la figura 2.2 se muestra los dos diferentes tipos de aditivos en alimentos; los que aumentan la vida útil de los alimentos (señalados por un recuadro color rojo), y los que aumentan el atractivo o calidad de los alimentos, mejorando o preservando su consistencia, su textura, su gusto o su olor.

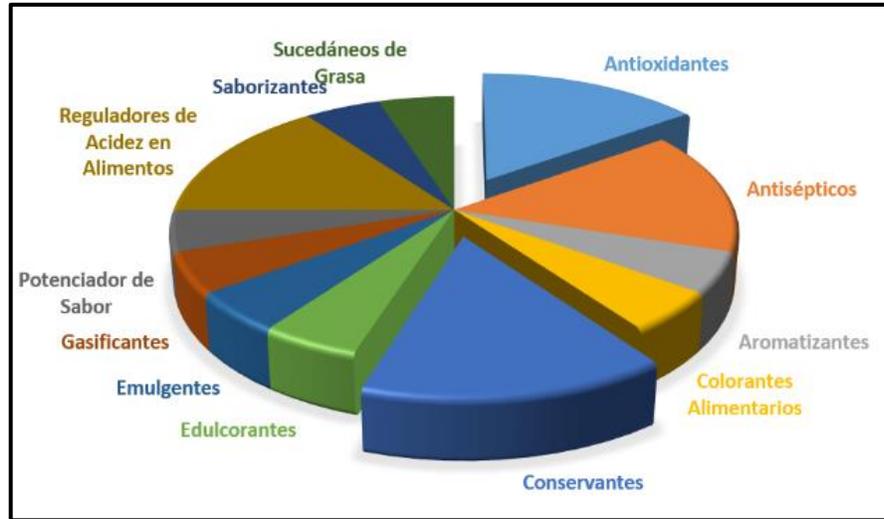


Figura 2.2. Clasificación de Aditivos Alimentarios.

- a) Antioxidantes. Evitan la oxidación de los alimentos e impiden el enranciamiento y la decoloración. Se utilizan en productos horneados, cereales, grasas y aceites, y en aderezos para ensaladas. Los principales antioxidantes liposolubles son: Tocoferoles (E306-309), BHA (Butilhidroxianisol ó E320) y BHT (Butilhidroxitoluol ó E321), evitan que las grasas alimenticias, los aceites vegetales y los aderezos para ensaladas se pongan rancios; El ácido ascórbico (E300) y ácido cítrico (E330) son antioxidantes que conservan el color de las frutas y verduras recién cortadas (Boyce, 1999).
- b) Antiséptico. Son sustancias que paralizan o inhiben el crecimiento y la reproducción de bacterias, hongos y virus. Son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican. Como antisépticos naturales y popularmente conocidos se encuentran: la sal, el azúcar, el ácido acético, los alcoholes y el humo de leña (Umit et al. 2009).
- c) Reguladores de Acidez en Alimentos. Los reguladores del pH (acidulantes, alcalinizantes y neutralizantes) son aquellos ácidos, bases y sales que se añaden a los productos alimenticios para controlar su acidez, neutralidad o alcalinidad. No presentan toxicidad alguna en general y se utilizan en bebidas refrescantes, zumos, conservas vegetales, galletas, pan, cerveza etc. Son de tipo inorgánicos como el

carbonato sódico, sulfato cálcico entre otros y orgánicos como el lactato cálcico, citrato sódico, etcétera.

- d) Conservantes. Permiten mantener los alimentos con sus cualidades nutritivas intactas, evitando que su descomposición. La principal causa de deterioro de los alimentos es la actividad de los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema de las alteraciones microbianas de los alimentos tiene implicaciones económicas, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). A los métodos físicos, como el calentamiento, deshidratación, irradiación o congelación, pueden asociarse métodos químicos que causen la muerte de los microorganismos o que al menos eviten su crecimiento (Elmadfa et al. 1991).

Existen diferentes motivos por lo cual se usan más algunos conservadores que otros; el nivel de toxicidad, el espectro de acción sobre los microorganismos, los costos, sin olvidar aquellos que tienden a acumularse en el organismo. En el siguiente apartado se describen los conservadores químicos empleados en tortilla de maíz nixtamalizada.

#### **2.1.5. Aditivos en Tortillas de Maíz.**

Las tortillas empacadas se fabrican principalmente con harina de maíz nixtamalizada, debido a que es fácil de transportar, almacenar, rehidratar y de incorporarle aditivos para blanquear, retener humedad, dar flexibilidad y prolongar su vida de anaquel. Estos ingredientes acumulados impactan al olor, sabor, color y textura del producto (Arámbula-Villa et al. 2007).

La tortilla está propensa al deterioro microbiano debido a su alto contenido de humedad (38% al 46%) que disminuye su vida útil. Gutiérrez et al. (2007) reportaron que el promedio de duración de una tortilla a temperatura de 25 a 30 °C es de 12 horas, periodo propicio para el crecimiento de microorganismos. Vázquez et al. (2011) mencionan que el uso adecuado de la cal en el proceso de nixtamalización del maíz determina casi todas las cualidades deseables de la tortilla tradicional, sabor, aroma,

color, capacidad para retener agua, flexibilidad y frescura duradera de cuatro días en promedio. El objetivo principal de los conservadores es retardar el crecimiento de microorganismos. Los conservadores más usados en la industria de la producción de harina de tortilla de maíz son los propionatos y los sorbatos. Según la Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, (Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba), en la elaboración de tortillas de maíz nixtamalizadas preenvasadas se permiten únicamente los aditivos referenciados en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Aditivos Usados en Tortilla de Maíz Nixtamalizada.

Nombre	Límite Máximo (mg/kg)	Observaciones
Ácido Acético Glacial	BPF	
Ácido Ascórbico	BPF	
Ácido Benzoico	2000	En harina de Maíz Nixtamalizado
	1000	En Tortillas
Ácido Cítrico	BPF	
Ácido D-L-Tartárico	BPF	
Ácido Fosfórico	BPF	
Ácido Fumárico	BPF	
Ácido Láctico	BPF	
Ácido Málico	BPF	
Ácido Propiónico <sup>1</sup>	BPF	
Ácido Sórbico <sup>1</sup>	3300	En harina de Maíz Nixtamalizado
	2000	En Tortillas
Alginato de Calcio	BPF	
Almidón Acetilado	BPF	
Almidón Oxidado	BPF	
Amarillo Ocaso FCF <sup>2</sup>	200	En Tortillas
Azul Brillante FCF <sup>2,3</sup>	250	Sólo en Tortillas
Benzoato de Sodio	2000	En harina de Maíz Nixtamalizado
	1000	En Tortillas

Tabla 2.1. Aditivos Usados en Tortilla de Maíz Nixtamalizada (Continuación).

Nombre	Límite Máximo (mg/kg)	Observaciones
Beta-apo-8'-carotenal	30	En Tortillas
Beta-caroteno sintético	30	En Tortillas
Carboximetilcelulosa de Sodio	BPF	
Carragenato de Calcio	BPF	
Carragenato de Potasio	BPF	
Carragenato de Sodio	BPF	
Carrageninas	BPF	
Celulosa Microcristalinas	BPF	
Citrato Tripotásico	BPF	
Citrato Trisódico	BPF	
Color Caramelo Clase I	BPF	
Color Caramelo Clase II	3200	En Tortillas
Color Caramelo Clase III y IV	4000	En Tortillas
Cúrcuma	BPF	
Dióxido de Titanio	BPF	
Estearoil-2-lactilato de Calcio	2000	
Estearoil-2-lactilato de Sodio	2000	
Esteres de Glicerol y Ácidos Grasos del Ácido Diacetil Tartárico	4000	
Esteres de Poliglicol y Ácidos Grasos	2000	
Etil Maltol	40	Sólo en Tortillas
Extracto de Innato	20	
Fosfato de Calcio Hidrogenado	5600	Sólo en Tortilla
Glicerol	BPF	Sólo en Tortillas
Goma Guar	BPF	
Hidroxipropilmetilcelulosa	BPF	
Indigotina <sup>2,3</sup>	30	En Tortillas
Lecitina	BPF	
Metabisulfito de Sodio	70	En Tortillas

Tabla 2.1. Aditivos Usados en Tortilla de Maíz Nixtamalizada (Continuación).

Nombre	Límite Máximo (mg/kg)	Observaciones
Metil p-hidroxibenzoato <sup>1</sup>	2000	En harina de Maíz Nixtamalizado
Metil p-hidroxibenzoato	1000	En harina de Maíz Nixtamalizado
Mono y diglicéridos	BPF	
Monoestearato de Sorbitán Polioxietilenado <sup>4</sup>	2000	
Oleoresina de Paprika	BPF	
Óxido de Calcio	BPF	
Pectinas	BPF	
Ponceau 4R <sup>2</sup>	320	En Tortillas
Propil p-hidroxibenzoato <sup>1</sup>	2000	En harina de Maíz Nixtamalizado
	1000	En Tortillas
Propionato de Calcio	BPF	
Propionato de Sodio	BPF	
Rojo Allura AC	50	
Sorbato De Potasio	2000	En Tortillas
Sorbitol	120 g/Kg	Sólo en Tortillas
Tartrazina <sup>2</sup>	600	En Tortillas
Triestearato de Sorbitán Polioxietilenado <sup>4</sup>	2000	

Arambula et al. (2001), reportaron que diversos conservadores pueden ser aplicados individualmente, o de manera combinada para aumentar la vida de anaquel de las tortillas de maíz. El propionato de sodio, benzoato de sodio y sorbato de potasio son algunos de los aditivos más populares, utilizados e incorporados directamente a los productos nixtamalizados, de acuerdo con la COFEPRIS (Comisión Federal para la

<sup>1</sup> Solo o combinado con otros conservadores permitidos.

<sup>2</sup> Cuando se use una mezcla de colorantes artificiales, la suma de éstos no debe exceder de 500 mg/kg de producto.

<sup>3</sup> sólo para efectos de estandarizar el color del maíz azul que se emplee para elaborar tortillas.

<sup>4</sup> Cuando se utilicen mezclas de Monoestearato de sorbitán polioxietilenado y Triestearato de sorbitán polioxietilenado, la suma de éstos no debe exceder del 1%.

Protección contra Riesgos Sanitarios). Cabe destacar que en el uso de propionato de sodio y otros aditivos no existe un límite máximo al aplicarlo en tortillas de maíz, queda a consideración de las buenas prácticas de fabricación (BPF). La Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002 define como buenas prácticas de fabricación, al conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones sanitarias requeridas para su uso o consumo. En particular en el caso de los aditivos se refiere a la cantidad mínima necesaria para lograr el efecto deseado.

#### **2.1.5.1. Ácido Sórbico.**

El ácido sórbico ( $C_6H_8O_2$ ) se usa en menos del 0.3% en peso para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras en los alimentos con un pH hasta de 6.5; su efectividad aumenta al reducir el pH. Se emplean en quesos, encurtidos, jugos de frutas, pan, vino, pasteles, mermeladas y otros (Badui, 2006). Tiene la característica de no acumularse en el organismo, debido a que puede ser metabolizado, se absorbe como fuente de energía. Su principal inconveniente es que es caro y el producto se pierde cuando se somete a ebullición (Villada-Moreno, 2010).

#### **2.1.5.2. Sorbato de Potasio.**

El sorbato de potasio ( $C_6H_7O_2K$ ) es la sal más usada para controlar hongos, aun cuando hay trabajos que muestran su efectividad contra Salmonella, S. aureus, Vibrio parahaemolyticus y C. botulinum. Los sorbatos se usan como sustituto de los nitritos y los nitratos en productos cárnicos, como salchichas y jamones; de igual manera se emplean soluciones al 5%. En algunas aplicaciones, su acción se mejora cuando se combina con otros ácidos, como el fórmico, el cítrico o el láctico (Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000).

#### **2.1.5.3. Ácido Benzoico.**

El ácido benzoico ( $C_7H_6O_2$ ) se encuentra naturalmente en arándanos, ciruela pasa, clavo y canela. El pH óptimo para tener actividad antimicrobiana es de 2.5 a 4.0.

Su uso se orienta a los alimentos ácidos como: jugos, encurtidos, cerezas, margarinas, aderezos, etcétera. El ácido benzoico es de bajo costo, al ingerirse concentraciones elevadas se pueden presentar convulsiones epileptiformes (Elmadfa et al. 1991).

#### **2.1.5.4. Benzoato de Sodio.**

El benzoato de sodio ( $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$ ) actúa sobre hongos y levaduras, además es el más utilizado en la industria alimentaria por su menor costo, pero tiene un mayor grado de toxicidad sobre las personas, además en ciertas concentraciones, produce cambios en el sabor del producto (Coronado y Rosales, 2001). Durante muchos años, el ácido benzoico ha sido la sustancia más empleada para proteger las margarinas, conservación de frutas ácidas y los zumos. Su presencia se detecta fácilmente por el sabor que aporta, incluso a dosis muy pequeñas (Bello, 2000).

#### **2.1.5.5. Ácido Acético.**

El ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), se encuentra presente en la mayoría de las frutas. Es producido por acetobacterias o bacterias acéticas (fermentación bacteriana) oxidan el etanol a ácido acético. Se usa en la conservación de alimentos de dos maneras; como vinagre del 5% al 10% y como soluciones acuosas de ácido acético sintético del 25% al 80%. El ácido acético previene el crecimiento de bacterias y hongos, por tal razón es empleado en productos ácidos (Cubero et al. 2002).

#### **2.1.5.6. Propionato de Sodio.**

La sal sódica del ácido propiónico ( $\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})$ ), es un ácido de origen natural presente en cantidades pequeñas en diversos alimentos y encontrado algunas veces en concentraciones altas en los alimentos fermentados al ser producido por las bacterias. El propionato de sodio (E-281) es efectivo para prevenir el desarrollo de hongos, bacilos productores de filamentación y de otras bacterias (Ibáñez et al. 2000).

#### **2.1.5.7. Propionato de Calcio.**

La sal cálcica de ácido propanoico ( $C_6H_{10}CaO_4$ ), físicamente es un polvo blanco cristalino de olor y sabor característico, al propionato de calcio le corresponde el número E-282 del *Codex Alimentarium* usado en Europa. Se utiliza como conservante y permite alargar el tiempo de un producto, conservándolo en buen estado, los propionatos son los aditivos con mayor efectividad inhibiendo el crecimiento de mohos y hongos. Es usado en productos ligeramente ácidos, además de que enriquece las formulaciones por suministrar calcio (Bello, 2000).

#### **2.1.5.8. Sorbato de Potasio.**

El sorbato de potasio ( $C_6H_7KO_2$ ) conocido comercialmente también como E-202, es un conservante sintético derivado del ácido sórbico. La función principal del sorbato de potasio es limitar, retardar o prevenir la proliferación de microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos. A diferencia del uso de ácido sórbico, es mucho más barato y más eficiente, debido a la característica que posee con respecto a la solubilidad, tanto en agua como ligeramente en etanol. El sorbato de potasio es totalmente inofensivo si se consume en cantidades recomendables, hasta el momento no se han encontrado efectos secundarios o dañinos de este producto (Villada, 2010).

#### **2.1.6. Justificación del Uso de Aditivos.**

Las siguientes recomendaciones son un extracto fiel del *CODEX Alimentarius*, Normas Internacionales de los Alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y de la Organización Mundial de la Salud:

El uso de aditivos alimentarios está justificado únicamente si ello ofrece alguna ventaja, no presenta riesgos apreciables para la salud de los consumidores, no induce a error a éstos, y cumple una o más de las funciones tecnológicas establecidas por el *CODEX* y los requisitos que se indican a continuación en los apartados a) al d), y únicamente cuando estos fines no pueden alcanzarse por otros medios que son factibles económica y tecnológicamente:

a) Conservar la calidad nutricional del alimento; una disminución intencionada en la calidad nutricional de un alimento estaría justificada en las circunstancias indicadas en el subpárrafo b) y también en otras circunstancias en las que el alimento no constituye un componente importante de una dieta normal.

b) Proporcionar los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas especiales.

c) Aumentar la calidad de conservación o la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas, a condición de que ello no altere la naturaleza, sustancia o calidad del alimento de forma que engañe al consumidor.

d) Proporcionar ayuda en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento del alimento, a condición de que el aditivo no se utilice para encubrir los efectos del empleo de materias primas defectuosas o de prácticas (incluidas las no higiénicas) o técnicas indeseables durante el curso de cualquiera de estas operaciones. (CODEX STAN 192-1995, 2018).

### **2.1.7. Toxicidad.**

El empleo de aditivos y otras sustancias se remonta varios siglos atrás, donde su uso se inicia en forma empírica ya que se utilizaban estos compuestos sin alguna regulación sanitaria o legal y el principal propósito de uso era ocultar los defectos de elaboración o las condiciones insalubres en la preparación de los alimentos. Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar caracterizada químicamente y debe superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los correspondientes organismos sanitarios. Al incorporar estas sustancias a los alimentos son necesarias pruebas que aseguren su inocuidad a las dosis idóneas para su uso (Iles-Ortiz y Gutierrez-Lesme, 2016).

Desde el punto de vista toxicológico, los aditivos no se pueden considerar malos ni buenos en sí mismos. El peligro potencial de un aditivo se relaciona con la concentración (o cantidad) ingerida en un periodo de tiempo. Para establecer ese peligro existe un índice capaz de medir la peligrosidad de un aditivo, este índice es la Ingesta Diaria Admisibile (IDA) y que se define como la cantidad aproximada de un

aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que se puede ingerir diariamente, durante toda la vida, sin que represente un riesgo apreciable para la salud. Algunas veces los efectos cruzados de los aditivos no son evaluados, lo cual puede provocar efectos nocivos a largo plazo (Suarez-Diequez et al. 2010).

La alimentación moderna está estrechamente vinculada al consumo de alimentos procesados, originando un aumento en la ingesta de sales, azúcares simples, fósforo, potasio y algunos aditivos añadidos. Debido a que los conservadores sintéticos son considerados como sustancias tóxicas para los microorganismos, se cree que afectan los procesos metabólicos del organismo humano, así como generar conductas de hiperactividad (Ibáñez-Pradas y García-Vera, 2008; McCann et al. 2007), Hipertensión Arterial (Saieh y Lagomarsino, 2009) (Kaczewer, 2002; Zengin et al. 2011), además se encontró relación positiva con el consumo de alimentos procesados o ultraprocesados con la obesidad, riesgo de diabetes, enfermedad renal crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer gástrico (Lou et al. 2021; Díaz y Glaves. 2020).

#### **2.1.8. Aspectos Legales.**

De acuerdo con la legislación mexicana, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios (1999), define como aditivo: Sustancia que se adiciona directamente a los productos durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor, para mejorar su estabilidad o para su conservación.

Queda prohibido su uso para: a) ocultar defectos de calidad; b) encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado; c) disimular materias primas no aptas para el consumo humano; d) ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte; e) reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos, y f) alterar los resultados analíticos de los

productos en que se agreguen. Se establecen los siguientes grupos de aditivos según su función:

1. Acentuadores de sabor: Sustancia o mezcla de sustancias destinadas a realzar los aromas o los sabores de los alimentos.

2. Acidulantes, alcalinizantes y reguladores de pH: Sustancia que modifica o mantiene la acidez o alcalinidad de los productos.

3. Acondicionadores de masa: Sustancia que se utiliza en panificación para mejorar diversas cualidades de la masa.

4. Antiaglomerantes: Sustancia o mezcla de sustancias que se agrega a los productos o aditivos para evitar su cohesión.

5. Antiespumantes: Sustancia o mezcla de sustancias que, adicionada durante la elaboración de los productos, disminuye la formación de espuma.

6. Antihumectantes: Sustancia que disminuye las características higroscópicas de los productos.

7. Antioxidantes: Sustancia o mezcla de sustancias destinada a retardar o impedir la oxidación y enranciamiento de los productos.

8. Antisalpicantes: Sustancia o mezcla de sustancias que, añadidas a las grasas emulsionadas con agua, evitan que al calentarlas se esparzan.

9. Clarificantes: Sustancia que elimina la turbidez en un líquido, dejándolo claro.

10. Colorantes y pigmentos: Sustancia que tiene la propiedad de impartir color al medio que lo contiene según la solubilidad que tenga en el medio, ya sea un medio hidrofílico o lipofílico o a otro material o mezcla, elaborado por un proceso de síntesis o similar, por extracción o por separación, obtenido de una fuente animal, vegetal o mineral y que posteriormente se ha sometido a pruebas fehacientes de seguridad que permiten su uso en alimentos y que, directamente o a través de su reacción con otras sustancias, es capaz de impartir el color que le caracteriza.

11. Conservadores: Sustancia o mezcla de sustancias que previene, retarda o detiene la fermentación, el enmohecimiento, la putrefacción, acidificación u otra alteración de los productos causados por algunos microorganismos y por algunas enzimas.

12. Edulcorantes no nutritivos: Sustancia natural o sintética, que puede sustituir parcial o totalmente el dulzor del azúcar.

13. Emulsificantes, emulsivos, estabilizadores, espesantes y gelificantes: Sustancia o mezcla de sustancias que mantiene homogéneos a los productos constituidos por dos o más fases inmiscibles, impidiendo su separación.

14. Enturbiadores: Sustancia o mezcla de sustancias que al agregarse a un líquido le resta claridad, o sirve para equilibrar la baja densidad de los aceites esenciales en un producto determinado.

15. Enzimas: Sustancia proteica producida por células vivas que catalizan reacciones específicas en diversos procesos de elaboración de productos.

16. Espumantes: Sustancia que, adicionada a un líquido, modifica su tensión superficial y estabiliza las burbujas formadas, o favorece la formación de espuma.

17. Gasificantes para panificación o polvos para hornear: Sustancia o mezcla de sustancias que adicionadas durante el proceso de elaboración de productos de panadería favorece el desprendimiento de dióxido de carbono.

18. Humectantes: Sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir la pérdida de humedad de los productos.

19. Leudantes: Levadura de cerveza prensada, húmeda o deshidratada, obtenida por proliferación del *Saccharomyces cereviceae*, empleada en productos de panadería para favorecer la formación del dióxido de carbono.

20. Oxidantes: Sustancia o mezcla de sustancias que por proceso de oxidación condiciona o mantiene determinadas características en algunos ingredientes de los productos y que también puede emplearse como blanqueador.

En la legislación mexicana se consideran 402 aditivos y coadyuvantes, 51 colorantes, 54 enzimas, 386 saborizantes sintéticos artificiales y 2,177 saborizantes idénticos al natural; esto hace un total de más de tres mil compuestos usados como aditivos y que pueden emplearse en la manufactura de alimentos. Por mucho, los saborizantes son el grupo más numeroso.

### **2.1.9. Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).**

Todos los aditivos alimentarios regulados por las disposiciones de la Norma General para los Aditivos Alimentarios CODEX STAN 192-1995 se emplearán conforme a las condiciones de buenas prácticas de fabricación, que incluyen lo siguiente:

a) La cantidad de aditivo que se añada al alimento se limitará a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado.

b) La cantidad de aditivo que pase a formar parte del alimento como consecuencia de su uso en la fabricación, elaboración o envasado de un alimento y que no tenga por objeto obtener ningún efecto físico o técnico en el alimento mismo, se reducirá en la mayor medida que sea razonablemente posible.

c) El aditivo será de una calidad alimentaria apropiada y se preparará y manipulará de la misma forma que un ingrediente alimentario (CODEX STAN 192-1995, 2018)

### **2.1.10. Bioconservadores.**

El uso de compuestos acidulantes en la conservación y mejora de propiedades organolépticas en alimentos es extenso. En particular, los ácidos que contiene uno o más carboxilos son aditivos alimentarios importantes. Estos ácidos, genéricamente denominados ácidos orgánicos, son intermediarios o productos terminales de ciclos metabólicos básicos por lo cual ocurren en una gran variedad de organismos vivos, tales compuestos incluyen los ácidos cítrico, málico, láctico, acético, tartárico, fumárico y glucónico (García-Garibay et al. 2004).

El efecto conservador parece que hay que atribuirlo a la elevada concentración de ácidos grasos de cadena corta, es decir, las moléculas normalmente responsables del aroma intenso de estas plantas, grupos fenólicos y otras sustancias con acción irritativa como son los picantes.

### **2.1.11. Aceites Esenciales.**

Actualmente existe la tendencia por consumir alimentos naturales, seguros y de buena calidad, los aceites esenciales extraídos de plantas y especias se distinguen por

tener efectos antimicrobianos, razón por la cual se han convertido en un área de investigación, con la finalidad de sustituir conservadores sintéticos por naturales.

Sun-Og et al. (2007) definen cómo aceites esenciales o simplemente esencias aquellas sustancias líquidas hidrofóbicas concentradas que contienen compuestos de aromas volátiles y que se obtienen de las plantas. Estas esencias se pueden encontrar generalmente en las hojas, las flores, los frutos y las semillas de las plantas.

#### 2.1.11.1. Clavo de Olor.

Originaria de Indonesia y también cultivada en México, su nombre es *Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata* o comúnmente clavo de olor, es una especia perteneciente a la familia *Myrtaceae*, la cual se caracteriza por habitar en ambientes tropicales. Se obtiene de un árbol perenne que florece dos veces al año. Los clavos son los capullos sin abrir. El aceite de clavo de olor ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad y alto rendimiento, de hecho, se considera por sus propiedades medicinales como estimulante contra trastornos digestivos (Pinto et al. 2009). En la tabla 2.2 se muestran la ficha técnica y algunas propiedades físico-químicas de la *Eugenia caryophyllata*.

Tabla 2.2. Algunas Propiedades del Clavo de Olor.

Ficha Técnica		
Identificación Química	Clavo de Especia, aceite	
Nombre Botánico	<i>Eugenia caryophyllata</i> , Thunb	
Punto de Inflamación	> 62 °C	
Punto de Ebullición	251 °C (760 mmHg)	
Aspecto	Líquido	
Color	Marrón Pálido-Marrón Oscuro	
Olor	Afrutado, Dulce, Especiado	
Propiedades Físico-químicas		
	Mínima	Máxima
Densidad 20 °C	1.040	1.065
Índice de Refracción 20 °C	1.5300	1.5450
Rotación Óptica (°)	-1.0	1.0
Eugenol (%)	85.00	---

En la figura 2.3 se muestra imagen del clavo de olor, Kamel Chaieb et al. (2007), mencionan que el clavo de olor posee amplios efectos dentro de las que destacan el antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico.



Figura 2.3. Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*).

#### **2.1.11.2. Tomillo.**

De origen francés, el *Thymus vulgaris* o mejor conocido como Tomillo es un subarbusto de la familia *Lamiaceae*, que es perenne y aromática, rica en aceite esencial, cuyo principal componente es el timol, se comercializa principalmente por sus hojas y aceite esencial. El aceite esencial está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, bor-neol y linalol. No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del aceite esencial es variable según la época y lugar de la cosecha (Borugă et al. 2014).

El aceite esencial de tomillo tiene un efecto antiséptico y antifúngico superior al del fenol y al del agua oxigenada. De hecho, en el siglo XIX y primera mitad del XX, cuando todavía no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante.

### **2.1.11.3. Lemon Grass (Hierba Limón).**

El *Cymbopogon citratus*, conocido comúnmente como zacate limón, té limón o hierba limón en México, se muestra en la figura 2.4, es una planta que pertenece a la familia de las gramíneas y se cultiva en casi todos los países tropicales y subtropicales. Se usa para la elaboración de bebida aromática y se emplea en la medicina tradicional en diversas partes del mundo (Schaneberg y Khan, 2002). Wannissorn et al. (1996) reportaron que el citral es el principal componente activo del aceite esencial del *Cymbopogon citratus*, otorgándole un olor característico a limón (Parikh y Desai, 2011). Diversos estudios han demostrado que algunos componentes del aceite de *Cymbopogon citratus* presentan efectos antimicrobianos y antifúngicos (Mohd et al. 2010).



Figura 2.4. Hierba Limón (*Cymbopogon Citratus*).

### **2.1.12. Aflatoxinas.**

La Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, define como aflatoxinas, a los metabolitos secundarios producidos por varios mohos, cuya estructura química es heterocíclica, pertenecientes al grupo de las bisfurano cumarinas. Poseen toxicidad aguda y crónica, así como efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales y hombre.

Son hongos con potencial micotoxigénico, pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las aflatoxinas, producidas por el género *Aspergillus*, pueden contaminar grano de maíz en diferentes etapas, estas toxinas en concentraciones muy bajas tienen efectos negativos en la salud.

*Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Parasiticus*, son las especies aflatoxigénicas de mayor impacto para la humanidad y están ubicadas en la sección *Flavi* (Peterson et al. 2000). Son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas, por lo que son las micotoxinas más estudiadas y controladas. Durante años se pensó que a través del proceso de nixtamalización podía eliminarse gran parte de unas sustancias tóxicas producidas por hongos comunes en el maíz; desafortunadamente, hoy en día se sabe que esto no es del todo cierto. El efecto tóxico de las aflatoxinas depende en algunos casos de las dosis, duración de la ingestión, edad, especie, sexo y del estado nutricional de la persona o animal que la ingiere (Martínez et al. 2013). La Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (LARC), clasifica a las micotoxinas de la siguiente manera (ver tabla 2.3).

Tabla 2.3. Clasificación de Micotoxinas de Acuerdo al Riesgo que Representan para la Salud Humana.

Micotoxina	Clasificación
Aflatoxinas	1
Aflatoxina M1	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Zearelanona	3
Deoxinivalenol	3
Nivalenol	3
Fusarenonan X	3
Toxina T-2	3

Dónde:

1	Agente carcinógeno en humanos
2B	Agente posiblemente carcinógeno pero la evidencia en humanos es limitada y tampoco existe suficiente evidencia en animales de experimentación.
3	Agente no clasificable como carcinogénico en humanos

Los responsables de la salud pública se enfrentan a un problema complejo, las micotoxinas deberían de eliminarse de los alimentos, sin embargo, como estos metabolitos secundarios se encuentra presenta en ciertos alimentos funcionales, debe tolerarse la exposición de la población a algún nivel de micotixinas. En la tabla 2.4 se muestran los límites máximos permisibles de aflatoxinas en productos derivados de maíz.

Tabla 2.4. Especificaciones de Aflatoxinas (NOM-187-SSA1/SCFI-2002).

Producto	Límite Máximo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Masa	12
Tortilla de maíz nixtamalizado	12
Tostada de maíz nixtamalizado	12
Harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortilla y tostadas	12

### 2.1.13. *Aspergillus Flavus*.

Uno de los grupos de hongos filamentosos más estudiados es la sección *Flavi*, al contener dos especies de *Aspergillus*; como el *Aspergillus Flavus* y el *Aspergillus Oryzae* (Rokas et al. 2007). El *Aspergillus Flavus* es el responsable de la producción de una micotoxonina potente, con características carcinogénicas, las aflatoxinas. Más recientemente, ha sido descrito como la segunda causa de aspergilosis en pacientes inmunodeprimidos (Hedayati et al. 2007; Rokas et al. 2007). El *Asperguillus Flavus* se describe, macroscópicamente, como un hongo aterciopelado, de color amarillo a verde o marrón, con reverso dorado a rojo-marrón (Figura 2.5).



Figura 2.5. *Aspergillus Flavus*.

#### **2.1.14. Vida Útil de un Alimento.**

El período de tiempo durante el cual se produce un deterioro tolerable de calidad se define como vida útil de un alimento, siempre que se garantice las condiciones de conservación que se indican en el etiquetado. La calidad es un concepto que viene determinado por la conjunción de distintos factores relacionados con la aceptabilidad del alimento, como sus características químicas, físicas y microbiológicas. Cuando alguno de ellos empieza a modificarse de manera negativa, el producto ha llegado al final de su vida útil.

En la tabla 2.5 se muestra la vida útil en días de algunos alimentos, donde se observa la rapidez con se descomponen estos. Una práctica común para fijar la vida útil de un alimento es mediante el uso de referencias bibliográficas o rangos establecidos por empresas en el ramo de alimentos, lo cual no garantiza la calidad e inocuidad del alimento, sino también pone en riesgo el prestigio de la empresa manufacturera.

Tabla 2.5. Vida Útil de Almacenamiento de Tejidos Vegetales y Animales (Casp y Abril, 2003)

Producto	Días de Almacenamiento a 21°C
Carne	1-2
Pescado	1-2
Aves	1-2
Carne y Pescado desecado, salado o ahumado	360 y más
Frutas	1-7
Frutas secas	360 y más
Hortalizas de hojas verdes	1-2
Raíces	7-20
Semillas secas	360 y más

Determinar la vida útil es la principal problemática a la que se enfrenta la industria de alimentos procesados. Y más aún en la introducción al mercado de nuevos productos se presenta la desventaja de requerir información sobre su evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento. Para esto se han desarrollado los estudios de vida útil acelerados.

Los métodos más utilizados para estimar la vida útil de un alimento se muestran a continuación:

- a) Prueba de vida útil en tiempo real: Este tipo de estudio consiste en mantener al alimento en las condiciones previstas para su almacenamiento, principalmente la temperatura.
- b) Prueba acelerada de vida útil: Este tipo de estudios sobreexponen al alimento a determinadas condiciones, para así obtener datos rápidamente, los cuales son modelados y analizados para obtener información sobre la vida de un producto bajo condiciones normales de uso.

## 2.2. Descripción del Problema.

Los seres humanos han procesado alimentos durante siglos, para preservar su tiempo de vida. Uno de los alimentos que más se consume en México y de forma procesada es el maíz y el principal producto es la tortilla, que es el componente más importante de la alimentación en la población mexicana. La tortilla de maíz es altamente perecedera y es afectada a nivel microbiológico por hongos como el *Aspergillus* (aflotoxina) (Salim et al. 2015). Razón por la cual dentro del proceso de elaboración de la tortilla se utilizan diferentes productos químicos para mejorar la apariencia, sabor y durabilidad de la misma, siendo los conservadores más populares el propionato de sodio, sorbato de potasio y el benzoato de sodio, cuyos efectos nocivos en la salud han sido registrados en diferentes publicaciones (Zengin et al. 2011; Saieh y Lagomarsino, 2009; Ibáñez y García, 2008; McCann et al. 2007, Kaczewer, 2002). Es aquí donde surge el interés de investigar, desarrollar y aplicar un conservador de alimentos de origen natural que sea seguro, eficiente y económico.

Algunos aceites esenciales tienen efecto conservante, siendo los más efectivos los aceites esenciales ricos en fenoles como el tomillo (*Thimus Vulgaris*), el clavo de olor (*Syzygium Aromaticum*). Es por eso que se pretende usar aceite esencial de clavo de olor, tomillo y hierba limón como conservadores orgánicos para preservar la vida de anaquel de la tortilla de maíz, y prevenir su deterioro por hongos, inhibiendo el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*.

## 2.3. Preguntas de Investigación.

1. ¿En qué grado los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón inhiben el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* en tortilla de maíz?
2. ¿De qué manera la aplicación de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como conservador de alimentos en tortilla de maíz, no afecta significativamente las propiedades del producto y preserva la vida de anaquel?

## **2.4. Hipótesis.**

H<sub>A</sub>: El uso de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como conservadores orgánicos preserva de manera significativa la vida de anaquel de la tortilla de maíz; inhibiendo el crecimiento de los hongos *Aspergillus Flavus*.

H<sub>B</sub>: A través de Metodologías de la Ingeniería de Confiabilidad, es posible evaluar la efectividad de los aceites esenciales de Clavo, Tomillo y Hierba limón como conservadores de alimentos, minimizando el efecto de crecimiento de hongos en la tortilla de maíz y maximizando su vida en anaquel.

## **2.5. Objetivos.**

A continuación, se muestran los propósitos fundamentales de esta investigación.

### **2.5.1. Objetivo General.**

Evaluar la eficiencia de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como bioconservadores mediante ingeniería de confiabilidad para determinar el tiempo en que se produce un deterioro en la calidad de la tortilla de maíz y así garantizar las condiciones de conservación del producto.

### **2.5.2. Objetivos Particulares.**

- a) Determinar la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de clavo de olor, tomillo y hierba limón que inhiba el crecimiento del hongo *Aspergillus flavus*.
- b) Determinar mediante pruebas aceleradas de almacenamiento, la estabilidad y vida útil en tortilla de maíz adicionada con aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como biconservador.

## **2.6. Justificación.**

El maíz además de contener nutrientes, contiene sustancias fisiológicamente activas que desempeñan una función beneficiosa en la reducción de enfermedades. Datos proporcionados por la ENA (Encuesta Nacional Agropecuaria, 2015), estima que cada habitante de México consume en promedio 188 kilogramos de maíz al año, lo que equivale a poco menos de medio kilogramo por día, considerando su consumo en diferentes presentaciones como son harinas, tortillas y botanas, entre otras.

La tortilla es un producto perecedero y la principal causa de descomposición de las tortillas es el crecimiento de los hongos, los cuales además de cambiar sus propiedades organolépticas producen micotoxinas, sustancias tóxicas que afectan la salud de quienes las ingieren. Los aditivos son sustancias que, una vez son incorporadas por parte de la fabricación industrial, no representan un coste, sino un beneficio, pero también los problemas de salud que desencadenan por el consumo de alimentos procesados.

En el proceso de elaboración de tortillas de maíz se emplean diferentes conservadores químicos, como el Propionato de Sodio, Propionato de Calcio, Sorbato de Potasio, Benzoato de Sodio y algunos acidificantes para incrementar la vida de anaquel de la tortilla de maíz, la Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, no marca un límite máximo en la adición de propionato de sodio en tortilla de maíz nixtamalizada, sólo se basa en las buenas prácticas de fabricación (BPF). Al no tener una regulación bien definida sobre la adición de conservadores químicos no existe protección para el consumidor. Es necesario elaborar productos procesados con una vida de anaquel prolongada, pero que a su vez no afecte la calidad del producto.

Actualmente el consumidor muestra interés por consumir productos sanos y libres de conservadores. De aquí que esta investigación propone la adición de aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierva limón como bioconservadores, de manera que inhiban el crecimiento del hongo en tortilla de maíz, y se reduzca los posibles efectos nocivos en la salud causados por el consumo de conservadores químicos y se ofrezca al consumidor un producto nutricionalmente más sano, manteniendo las cualidades nutritivas de la tortilla y preservando su vida en anaquel. Así mismo, esta

investigación, se justifica en el hecho de que, hasta el momento, en la literatura revisada no se ha encontrado estudios de vida útil, utilizando ingeniería de confiabilidad aplicados a bioconservadores en tortilla de maíz.

### **2.7. Delimitaciones.**

Se evaluará la factibilidad y viabilidad de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como una alternativa de conservación de producto de tortilla de maíz para preservar su vida de anaquel, vida útil, consumo preferente etcétera, cumpliendo con las expectativas actuales del consumidor, así como la aceptabilidad del producto, manteniendo las cualidades nutritivas del alimento.

### **3. MARCO TEÓRICO.**

En seguida se muestra una serie de conceptos que funcionan como supuestos teóricos que posibilitan el proceso de investigación. Se abordan conceptos de degradación entre otros que se consideraran más adelante.

La industria del maíz se siente motivada por desarrollar nuevos productos que registren alta duración, que sean confiables al consumir y sobre todo que tengan una alta calidad. Esto ha motivado a implementar métodos en ingeniería y ampliar el uso de diseños de experimentos para productos y así mejorar su proceso. Las pruebas de vida aceleradas son muy usadas en la industria manufacturera, particularmente para obtener información de la confiabilidad de sus componentes y materiales.

Los modelos de pruebas de vida acelerada tienen las siguientes dos componentes: Una distribución de vida que representa la dispersión de la vida del producto y la relación vida esfuerzo. Las distribuciones más usadas para pruebas de vida son: exponencial, normal, lognormal, Weibull, entre otros (Nelson, 2004).

#### **3.1. Modelos de Falla.**

Los tiempos de falla o vida de los productos se pueden estimar por medio de pruebas de confiabilidad completas, diseñando estas con el fin de provocar la falla y de determinar las causas de falla para efectuar modificaciones al diseño, determinar la confiabilidad de las partes del diseño, establecer tiempos de garantía, etc. Las pruebas de vida acelerada son diseñadas para comprobar si los productos pueden cumplir con los requerimientos establecidos por el cliente desde el punto de vista de su confiabilidad para realizar su función de diseño.

Meeker y Escobar (1998), Nelson (2004) y Ebeling (2010) coinciden en definir confiabilidad como la probabilidad de que un dispositivo trabaje sin fallas, por un periodo preestablecido de tiempo, bajo condiciones normales de operación. De esta definición es posible relacionar el concepto de probabilidad con una función de

densidad de probabilidad (fdp), la cual podrá ser determinada mediante los datos generados en la prueba de vida acelerada. El periodo preestablecido de tiempo servirá para establecer el tiempo y el tipo de prueba necesario para predecir la vida de los dispositivos en su uso normal de campo. Las condiciones de uso normal mencionadas en la definición serán utilizadas para establecer la condición o condiciones (estrés múltiple) de estrés en la prueba.

Los estudios de campo, el diseño de las pruebas de vida acelerada, el número de piezas probadas requieren un análisis cuidadoso y son de alto costo, lo que conlleva a una meticulosa planeación del plan de prueba. Una de las cuestiones a resolver al establecer un plan de prueba es, primeramente, el número de unidades a probar que nos permita estimar una fdp y calcular los cuartiles, tal como el percentil 1 o la mediana. La siguiente cuestión a resolver es sobre el tiempo de prueba necesario para hacer estimaciones correctas. Una idea sencilla y fácil de llevar a cabo es incrementar el número de unidades de prueba y el tiempo de prueba, lo cual necesariamente mejora la precisión de la estimación.

Las propiedades de los planes de prueba se deberán basar, principalmente, sobre el modelo en el diseño y los parámetros del modelo, lo cual será fundamental para estimar el efecto que el tamaño de la muestra y el tiempo de prueba tendrán sobre los resultados de los planes de prueba. Generalmente, la información básica se obtiene de especificaciones de diseño, opiniones de expertos, o experiencia previa en materiales o productos similares. (Meeker y Escobar, 1998).

Yang (2007) menciona que el incremento en la competitividad a nivel mundial ha establecido una gran presión sobre los fabricantes para desarrollar productos con una mayor confiabilidad, a un menor costo y en un tiempo menor. Los cambios en el mercado internacional han obligado a los fabricantes a introducir programas para el mejoramiento de la confiabilidad, que incluyan pruebas de vida acelerada ALT (*Accelerated Life Test* por sus siglas en inglés). Unos productos sometidos a una ALT, a niveles de estrés mayores que los de uso normal sufrirán un acortamiento en sus periodos de aparición de fallas. Los datos obtenidos son extrapolados mediante una relación vida-esfuerzo para estimar su distribución de vida a condiciones normales.

La fuerte competencia internacional en los mercados actual ha reducido los tiempos para el lanzamiento de nuevos productos, y, por ende, los tiempos para efectuar pruebas de vida acelerada. Los avances en tecnologías de diseño, materiales y capacidades de manufactura han incrementado la confiabilidad de los productos, de tal manera que la aparición de fallas en los productos en ALT sea mucho menor a niveles de bajo estrés, lo que dificulta el análisis de datos de vida y en consecuencia, hacer inferencias válidas sobre funciones de comportamiento de la confiabilidad. Así entonces, para algunos productos con características de desempeño que sufren una degradación con el tiempo, se dice que tienen una falla cuando el nivel de desempeño cruza un límite especificado, y, por tanto, la degradación de la característica indica un deterioro de la confiabilidad.

Las pruebas de degradación tienen algunas ventajas sobre una prueba de vida acelerada. La primera de ellas es que, el análisis de la confiabilidad usando datos de degradación directamente, relaciona la confiabilidad del producto con las características físicas del mismo. Esto hace que, al observar el proceso de degradación de la característica de desempeño, sea posible establecer el comportamiento de la confiabilidad, aún antes de que el artículo haya fallado, lo que hace que se acorte de manera considerable el tiempo de prueba (Yang, 2007).

Meeker y Escobar (1998) coinciden con Yang (2007), al afirmar que los datos de degradación sin fallas (datos censurados) o con algunas fallas proveen considerablemente más información que los datos tradicionales de tiempo de falla censurados. Asimismo, mencionan que la observación directa de la degradación física permitirá el modelado del mecanismo de la causa de falla, generando una mejor estimación y una mayor credibilidad de la confiabilidad.

### **3.1.1. Conceptos Básicos de Análisis de Supervivencia.**

El análisis de supervivencia es una técnica inferencial cuyo principal objetivo es examinar y modelar el tiempo que se toma para que ocurra un determinado suceso. Generalmente, dada las innumerables aplicaciones de estas técnicas en el ámbito

médico, el suceso es comúnmente denominado muerte y el tiempo como tiempo de vida.

Este análisis consiste en un seguimiento continuo de una serie de individuos desde que comienza el estudio hasta que finaliza. Según Kleinbaum y Klein (2012), la variable de interés es conocida como tiempo de vida o tiempo de supervivencia; además, se consideran las observaciones censuradas, que son aquellas observaciones que desaparecen del estudio o aquellas observaciones en las que no se produce el suceso de interés antes de finalizar el estudio.

### **3.1.1.1. Datos Censurados.**

Al realizar un análisis general en tiempos de vida se espera utilizar todos los datos que se encuentren disponibles, pero en el análisis de tiempos de vida a menudo ocurre que todos o algunos de los datos presentan el problema de estar incompletos o incluyen incertidumbre respecto a cuándo ocurrió la falla.

Por esto, los datos de vida son clasificados en dos categorías: Completos o no censurados; donde toda la información está disponible y, censurados; donde un poco de la información está perdida (Lucijanic y Petrovecki, 2012).

Un dato en el tiempo  $t$  se dice que es completo si representa el tiempo exacto en el que ocurrió la falla de la unidad o individuo (tiempo de vida).

En muchos casos cuando los datos de vida son analizados, y todas las unidades o individuos en la muestra podrían no haber fallado (el evento de interés no fue observado) o los tiempos exactos de vida (tiempos en que ocurrieron las fallas) de las unidades no son todos conocidos, se denominan datos censurados (Gomez et al. 1992).

Se introduce una notación para los datos censurados, donde  $n$  individuos tienen tiempos de vida representados por las variables aleatorias  $T_1, T_2, \dots, T_n$ , donde  $t_i$  es el tiempo de vida o tiempo censurado.

$$\delta_i = I(T_i = t_i) = \begin{cases} 1 & T_i = t_i \\ 0 & T_i > t_i \end{cases} \quad (3.1)$$

Por otro lado, sea la variable llamada indicador de censura o indicador de estado para  $t_i$ , que indica  $t_i$  es observado en el tiempo de vida,  $\delta_i = 1$  o presenta censura de tiempo,  $\delta_i = 0$ .

Los principales tipos de censura que suelen considerarse son:

a) Censura tipo I: Se observa un número de sujetos desde el instante  $t = 0$ , incluyendo el tiempo en el que falla cada uno y finaliza en un tiempo fijado previamente  $t = t_f$ . Los sujetos que al finalizar el estudio no presenten fallo, formarán las observaciones censuradas. Si  $T$  denota el tiempo de fallo:

$$\begin{cases} T \leq t_f & \text{Observado} \\ T > t_f & \text{Censurado} \end{cases} \quad (3.2)$$

b) Censura tipo II: Es donde los individuos son observados hasta que ocurra un número determinado de fallas o eventos de interés; esto es, al inicio de un estudio se decide observar hasta registrar  $r$  fallas, en la cual hay dependencia del tamaño de muestra (denotado por  $n$ ) y las fallas que se observen. Aquí, todos los individuos son puestos en estudio al mismo tiempo y se da el término de este cuando  $r$  de los  $n$  individuos han presentado el evento de interés, donde  $r$  es un número entero positivo determinado previamente por el investigador, y es tal que  $r < n$ . En conclusión, la censura tipo I es determinística y la censura tipo II es aleatoria.

c) Censura aleatoria: Este tipo ocurre sin ningún control del investigador ya que pueden ser por diversas causas. Por ejemplo, en un estudio biomédico:

Desidia: el paciente abandona el ensayo.

Salida obligada: los efectos del tratamiento le mandan a dejar el estudio.

Fin del estudio: termina el ensayo y no se produce el suceso de interés.

d) Censura por la derecha: Se define así porque el límite inferior en el tiempo de vida es válido para algunos individuos. Los datos censurados por la derecha pueden ocurrir por varias razones; cuando las pruebas se planifican, por ejemplo, si se decide

terminar la prueba antes de que todos los artículos tengan fallas. Cuando las pruebas no se planifican, este tipo de censura ocurre si el tiempo exacto de vida  $t$  de un individuo no es observado, pero se conoce que excedió un cierto tiempo, por ejemplo,  $t^+$  en la figura 3.1.

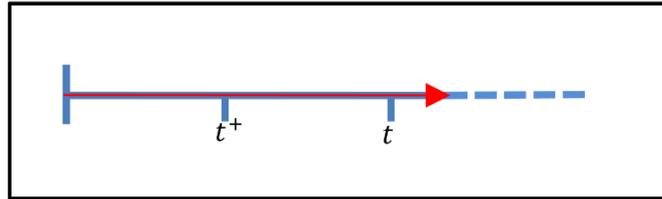


Figura 3.1. Censura por la Derecha.

e) Censura por la izquierda: Este tipo de censura resulta cuando se sabe que el tiempo exacto  $t$  de la falla de una unidad ocurrió antes de un cierto tiempo  $t^+$  como se muestra en la figura 3.2. Por ejemplo, se puede conocer que cierta unidad falló antes de las 100 horas pero no se conoce exactamente cuándo. En otras palabras, tal unidad podría haber fallado en algún tiempo entre 0 y 100 horas. Esto es idéntico a datos censurados por intervalos en los cuales el tiempo de inicio del intervalo es cero, como se describe posteriormente (Kartsonaki, 2016).

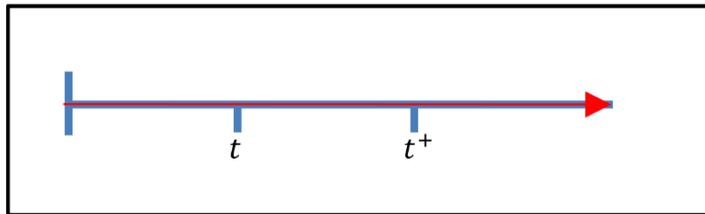


Figura 3.2. Censura por la Izquierda.

f) Censura por intervalo: la observación de los sujetos no sucede de forma continua por lo que entre un tiempo de fallo y otro hay un periodo largo de observación.

### 3.2. Funciones de Confiabilidad.

Lucijanic y Petroveckí (2012) mencionan que sea  $T$  el tiempo de supervivencia, considerado  $T$  como una variable aleatoria continua. Se denota  $f(x)$  como su fdp y  $F(x)$

como su función de distribución. Por ejemplo, en la distribución Exponencial dichas funciones son expresadas en las ecuaciones 3.3 y 3.4:

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad (3.3)$$

$$F(x) = 1 - e^{-\lambda x} \quad (3.4)$$

Las siguientes funciones permiten dar respuesta en muchas de las preguntas que surgen en este tipo de estudios. La confiabilidad engloba varias actividades y una de ellas es el planteamiento de modelos de confiabilidad, esto es básicamente la probabilidad de supervivencia del sistema y se expresa como una función de las confiabilidades de los componentes o subsistemas, que generalmente, se encuentran dependiendo del tiempo.

- a) Función de distribución acumulada: Es llamada distribución de vida y se denota como  $F(t)$ , se interpreta como la proporción de componentes, equipos, productos que fallan hasta el tiempo  $t$ . Pohar y Stare (2006) describen que la función de distribución acumulada en la ecuación 3.5 de la siguiente forma.

$$F(t) = \int_0^t f(x) dx, \quad t \in [0, \infty] \quad (3.5)$$

Donde  $t$  es la variable aleatoria que indica el tiempo de fallas. La función de distribución acumulada se interpreta de la siguiente manera: La probabilidad o seguridad de un producto falle antes de  $t$  unidades de tiempo. Y la fracción de la población que falla antes de  $t$  unidades de tiempo (Aakshi, 2016).

- b) Función de confiabilidad: Se centra en los productos que no fallan en un tiempo  $t$ , es un complemento de la función de distribución acumulada, y se define como se muestra en la ecuación 3.6 (Kartsonaki, 2016). Esta función se interpreta como la probabilidad de que un producto no falle antes del tiempo  $t$ , como se muestra en la figura 3.3.

$$R(t) = 1 - F(t) \quad (3.6)$$

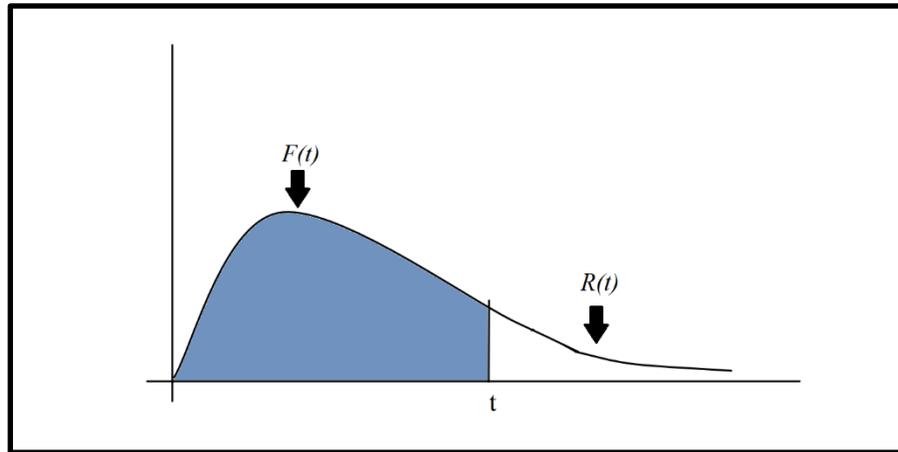


Figura 3.3. Gráfica de Función de Confiabilidad.

- c) Función de riesgo o tasa de fallo instantánea: Según Sparling et al. (2006), en esta función los productos que la tasa de falla  $h(t)$  son números de entidades que fallan por unidad de tiempo.  $h(t)$  no es una probabilidad y puede tomar valores arriba de 1. La función de riesgo especifica la tasa de muerte en el tiempo  $t$ , dado que un objeto ha sobrevivido hasta el tiempo  $t$ .

$$TF(t, t + \Delta t) = \left[ \frac{F(t + \Delta t) - F(t)}{t + \Delta t - t} \right] \left[ \frac{1}{R(t)} \right] \quad (3.7)$$

Donde:

$F(t + \Delta t)$ , es la función de probabilidad acumulada en el tiempo  $t + \Delta t$ .

$F(t)$ , es la función de probabilidad acumulada en el tiempo  $t$ .

$R(t)$ , función de confiabilidad.

$h(t)$ , se obtiene cuando el incremento de  $t$  es cercano a cero y se define como en la ecuación 3.8.

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} TF(t, t + \Delta t) = \frac{1}{R(t)} \left[ \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{F(t + \Delta t) - F(t)}{\Delta t} \right] = \frac{F'(t)}{R(t)} = \frac{f(t)}{R(t)} \quad (3.8)$$

De esta manera  $h(t)$  aproxima la probabilidad de falla de muerte en el intervalo de tiempo  $(t, t + \Delta t)$ , dado que sobrevive hasta el tiempo  $t$ .

### 3.2.1. Probabilidades a Analizar

Yang (2007) menciona que en los eventos independientes están las fallas o la sobrevivencia de  $n$  opciones elegidas aleatoriamente operando independientemente. Es decir, la probabilidad que  $n$  productos idénticos independientes, cada uno con una función de confiabilidad de  $R(t)$ , sobreviva después de  $t$  horas es  $[R(t)]^n$ .

La probabilidad que al menos uno de los  $n$  productos idénticos independientes falle en el tiempo  $t$  esta dada por la ecuación 3.9:

$$1 - [R(t)]^n = 1 - [1 - F(t)]^n \quad (3.9)$$

Si se considera un sistema compuesto por  $n$  productos idénticos, todos operando independientemente, en términos de trabajar y fallar cada uno de ellos. Si la distribución de vida de los productos en  $F(t)$  y la probabilidad del sistema cuando no está fallando hasta el tiempo  $t$  es  $[R(t)]^n$  y si el sistema falla cuando el primero de estos productos falla además indica la función de distribución de vida para la población de este sistema  $F_s(t)$ , la regla de complementos es como se marca en la ecuación 3.10.

$$F_s(t) = 1 - [R(t)]^n \quad (3.10)$$

### 3.3. Función Acumulada de Falla.

$H(t)$ , se obtiene integrando la función de tasa de falla en un intervalo de  $0 \leq t < \infty$ .

$$H(t) = \int_0^t h(x)dx \quad (3.11)$$

La integral de la ecuación 3.11 se puede expresar de la siguiente manera (Xie y Liu, 2005).

$$H(t) = -\ln R(t) \quad (3.12)$$

Conociendo lo anterior mostrado en la ecuación 3.12, se despeja  $R(t)$ , obteniendo lo siguiente:

$$R(t) = e^{[-H(t)]} \quad (3.13)$$

$$1 - F(t) = e^{[-\int_0^t h(x)dx]} \quad (3.14)$$

$$F(t) = 1 - e^{-\int_0^t h(x)dx} \quad (3.15)$$

La ecuación 3.15 establece la relación entre la función de riesgo y la función de distribución acumulada.

### 3.4. Métodos No Paramétricos.

Los métodos incluidos con el análisis de supervivencia se pueden clasificar en métodos paramétricos y métodos no paramétricos. Entre los métodos no paramétricos, los más usados son el estimador de Kaplan-Meier y la comparación de curvas de supervivencia.

Según Manish et al. (2010), el principal objetivo del estimador de Kaplan-Meier es estimar la probabilidad de supervivencia en un grupo de sujetos en un intervalo de tiempo definido; es el método más usado para estimar las funciones mencionadas anteriormente.

Para datos no censurados se puede estimar la función de supervivencia mediante la función de supervivencia empírica, menciona que dada una muestra de  $n$  observaciones obtiene:

$$S_n(t) = \frac{1}{n} \text{Card} \{i: t_i > t\} \quad (3.16)$$

Dónde:

$\text{Card}(A)$  es el número de elementos de  $A$ .

$S_n$  es un estimador consistente de  $S(t)$ .

$$\forall t, \quad nS_n(t) \sim \text{Bi}[n, S(t)]; \quad \forall t, \quad S_n(t) \xrightarrow[n \rightarrow \infty]{} N \left[ S(t), \frac{S(t)(1-S(t))}{n} \right] \quad (3.17)$$

En el caso de que esta investigación tenga observaciones censuradas, el estimador de Kaplan-Meier es un poco más complejo. Según la censura a la derecha, observamos dos pares formados por  $(Y_i, \delta_i); \quad i = 1 \dots n$ .

$$Y_i = \min\{T_i, C_i\} \quad \delta_i = \begin{cases} 1 & \text{si } T_i \leq C_i (\text{observado}) \\ 0 & \text{si } T_i > C_i (\text{censurado}) \end{cases} \quad (3.18)$$

Los tiempos esperados observados permiten construir un conjunto  $n' \leq n$  intervalos.

$$I_i = (y_{i-1}, y_i) \quad \text{para } i = 1, \dots, n \quad (3.19)$$

Sean los parámetros:

$n_i$ : persona vivas y no censuradas justo antes que  $y_i$ .

$d_i$ : personas que fallecen en  $y_i$ .

$p_i = \text{Pr}[(\text{sobrevivir a } I_i | \text{vivo al comienzo de } I_i)] = \text{Pr}[(T > y_i | T > y_{i-1})]$

$q_i = 1 - p_i = \text{Pr}[(\text{fallo en } I_i | \text{vivo al comienzo de } I_i)] = \text{Pr}[(T \leq y_i | T > y_{i-1})]$

A continuación, se muestran los estimadores de Kaplan-Meier (Aakshi, 2016):

a) Función de supervivencia. Aplicando la probabilidad condicional ( $\text{Pr}[A \cap B] = \text{Pr}(A|B)\text{Pr}(B)$ ) se obtiene la siguiente expresión para  $S(t)$  (ver ecuación

3.20).

$$S(t) = Pr[T > t] = \prod_{i: y_i \leq t} p_i \quad (3.20)$$

Por tanto, considerando los estimadores de las ecuaciones 3.21 y 3.22:

$$\hat{p}_1 = \frac{d_i}{n_i} \quad (3.21)$$

$$\hat{q}_1 = 1 - \hat{p}_1 = 1 - \frac{d_i}{n_i} = \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad (3.22)$$

Se obtiene el estimador no paramétrico de la función de supervivencia propuesto por Kaplan-Meier:

$$\hat{S}(t) = \prod_{i: y_i \leq t} \hat{p}_1 = \prod_{i: y_i \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad (3.23)$$

$$k = y_{(k)} \leq t << t_{i+1}$$

b) Estimación de la tasa de fallo instantánea. Que mediante el estimador de Kaplan-Meier en un intervalo, se muestra en la ecuación 3.24:

$$\hat{h}(t) = \frac{d_i}{n_i(t_{i+1} - t_i)} \quad i: t_i \leq t < t_{i+1} \quad (3.24)$$

c) Estimación de falla acumulada. Mediante estimadores de Kaplan-Meier:

$$\hat{H}(t) = -\ln[\hat{S}(t)] = -\ln \prod_{i: y_i \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad (3.25)$$

$$\widehat{var}[\hat{H}(t)] = \sum_{i: y_i \leq t} \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \quad (3.26)$$

d) Estimación del tiempo medio de vida truncada. Habitualmente, el tiempo medio de vida se estima a través de la ecuación 3.27:

$$\hat{E}[T] = \int_0^{y_n} \hat{S}(t) dt \quad (3.27)$$

Cuando  $y_n = \max\{y_i\}$  no esté censurada, la integral anterior coincide con la que se obtiene en el intervalo  $[0, \infty)$ ; pero en el caso de que esté censurada, el  $\lim_{t \rightarrow \infty} \hat{S}(t) \neq 0$ , por lo que la integral en el intervalo definido anteriormente no está definida. Para evitar este problema, se considera  $y_n$  como si no estuviera censurada, obteniendo el estimador de la media sesgado (ver ecuación 3.28), el cual coincide con la curva de Kaplan-Meier:

$$\hat{E}[T] = \sum_{i=1}^n [y_i - y_{i-1}] \hat{S}(y_i) \quad (3.28)$$

Otro problema de interés en el análisis de supervivencia que se aborda a través de métodos no paramétricos es la comparación de curvas de supervivencia. Trata de contrastar la igualdad de dos funciones de supervivencia, o bien, la igualdad de dos funciones de distribución de tiempos de supervivencia  $F_1$  y  $F_2$ , siendo la hipótesis nula  $H_0: F_1 = F_2$ . En la figura 3.4 se muestra una situación como la anterior descrita, con la representación de las estimaciones de Kaplan-Meier.

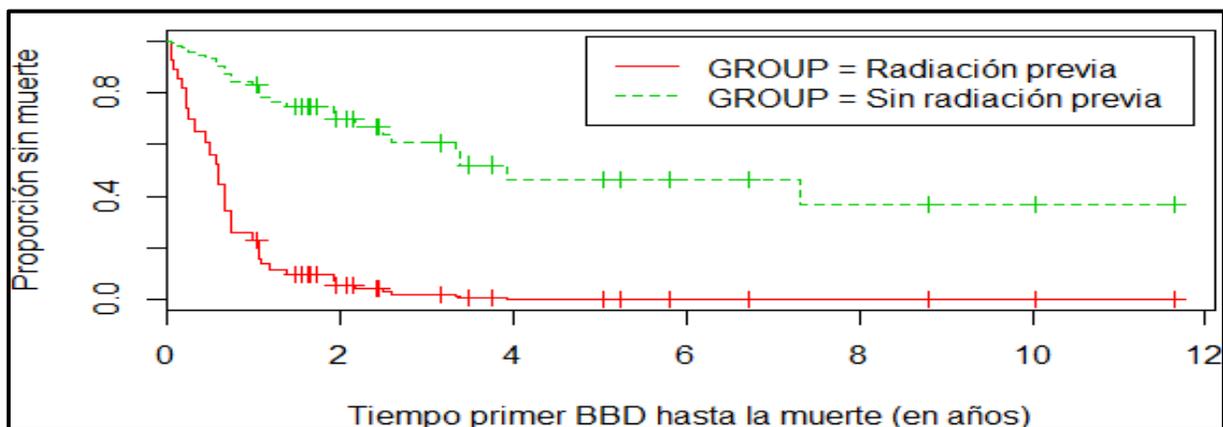


Figura 3.4. Estimación de la Función de Supervivencia (Velazco, 2015).

Para esta comparación, el método no paramétrico más utilizado es la construcción de tablas de doble entrada para cada fallo (ver tabla 3.1), siempre considerando ambos grupos (Rich et al. 2010).

Se supondrá que los tiempos observados son  $t_1 \leq t_2 \leq \dots \leq t_n$ , expresando el número total de casos en riesgo de la siguiente forma  $n_j = n_{j1} + n_{j2}$ .

Tabla 3.1. Tabla de Doble Entrada

Tiempo: $t_j$	Grupo 1	Grupo 2	Total
Fallos	$d_{j1}$	$d_{j2}$	$d_{j3}$
No Fallos	$n_{j1} - d_{j1}$	$n_{j2} - d_{j2}$	$n_{j3} - d_{j3}$

Bajo la hipótesis nula, una vez que tenemos fijadas las marginales, la variable  $X_j$  “número de fallos en el grupo 1 en el instante  $j$ ” se distribuye según una distribución hipergeométrica:

$$X_j | n_j, n_{j1}, d_j \sim H[n_j, n_{j1}, d_j] \quad (3.29)$$

Por lo tanto, se obtiene la siguiente media y varianza:

$$E[X] = \frac{n_{j1} d_j}{n_j} \quad (3.30)$$

$$Var[X] = \frac{n_j - d_j}{n_j - 1} \frac{n_{j1} d_j}{n_j} \left(1 - \frac{n_{j1}}{n_j}\right) = \frac{n_{j1} n_{j2} d_j (n_j - d_j)}{n_j^2 (n_j - 1)} \quad (3.31)$$

Las distribuciones condicionadas son asintóticamente independientes:

$$X_j | r[t_j], r_1[t_j], D_j \quad j = 1 \dots n$$

Jager et al. (2008) menciona que tanto los valores observados como los esperados se pueden comparar con el siguiente estadístico, convirtiéndose en una distribución chi-cuadrado asintóticamente como se muestra en la ecuación 3.32:

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^N \left( d_{j1} - \frac{n_{j1}d_j}{n_j} \right)}{\left[ \sum_{j=1}^N \frac{n_{j1}n_{j2}d_j (n_j - d_j)}{n_j^2(n_j - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (3.32)$$

O por una ponderación adecuada  $w[t_j]$ :

$$G = \frac{\sum_{j=1}^N w[t_j] \left( d_{j1} - \frac{n_{j1}d_j}{n_j} \right)}{\left[ \sum_{j=1}^N w^2[t_j] \frac{n_{j1}n_{j2}d_j (n_j - d_j)}{n_j^2(n_j - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (3.33)$$

Bajo  $H_0: G \sim \chi_1^2$ , diversos estadísticos propuestos en este esquema de ponderación son los siguientes:

- a)  $w(t_j) = 1$  para todo  $j$ =test de log-rangos de Mantel-Haenszel.
- b)  $w(t_j) = n_j$  para todo  $j$ =test de Wilcoxon generalizado.
- c)  $w(t_j) = \text{raíz cuadrada } (n_j)$  para todo  $j$ =test de Tarone y Ware
- d)  $w(t_j) = \left[ \hat{S}_{t_{j-1}} \right]$  para todo  $j$ =test de Fleming-Harrington siendo  $\hat{S}_{t_{j-1}}$  un estimador de K-M.

### 3.5. Métodos Paramétricos.

Una cantidad grande de modelos paramétricos son utilizados en el análisis de datos de tiempo de fallo. Pero algunas distribuciones de probabilidad ocupan un papel importante en esta clase de modelos, por ser ampliamente utilizadas en un gran número de situaciones prácticas. Según Boyce (1999), las distribuciones de probabilidad más usadas en los métodos paramétricos son:

1. Distribución Exponencial,  $T \sim \text{Exp}(\lambda)$  para  $\lambda > 0$ :

$$a) \quad f(t) = \lambda e^{-\lambda t} \quad (3.34)$$

$$b) S(t) = e^{-\lambda t} \quad (3.35)$$

$$c) h(t) = \lambda \quad (3.36)$$

$$d) H(t) = \lambda t \quad (3.37)$$

2. Distribución Gamma, una variable aleatoria tiene una distribución gamma si su función de densidad está dada por (Muñoz, 2014):

$$f(t) = \frac{1}{\lambda^k \Gamma(k)} t^{k-1} e^{-\frac{t}{\lambda}} \quad (3.38)$$

Para  $t > 0; k, \lambda > 0$ .

3. Distribución Weibull,  $T \sim W(\beta, \alpha)$  con  $\beta, \alpha > 0$  (Valencia, 2019):

$$a) f(t) = \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (3.39)$$

$$b) S(t) = e^{-(\alpha t^\beta)} \quad (3.40)$$

$$c) h(t) = \frac{f(t)}{S(t)} = \beta \alpha t^{\beta-1} \quad (3.41)$$

$$d) H(t) = \alpha t^\beta \quad (3.42)$$

4. Distribución del valor extremo, tipo Gumbel,  $EV(\mu, \alpha)$  con  $-\infty < \mu < \infty, \sigma > 0$ :

$$a) f(t) = \frac{1}{\sigma} e^{\left[\frac{y-\mu}{\sigma} - \exp\left(\frac{y-\mu}{\sigma}\right)\right]} \quad -\infty < \mu < \infty \quad (3.43)$$

$$b) S(t) = e^{\left[-\exp\left(\frac{y-\mu}{\sigma}\right)\right]} \quad (3.44)$$

$$c) h(t) = \frac{1}{\sigma} e^{\left[\frac{y-\mu}{\sigma}\right]} \quad (3.45)$$

$$d) H(t) = e^{\left[\frac{y-\mu}{\sigma}\right]} \quad (3.46)$$

5. Distribución log-normal,  $T \sim \text{LogN}(\lambda, \alpha)$  con  $\lambda, \alpha > 0$ :

$$\text{a) } f(t) = (2\pi)^{-\frac{1}{2}} \alpha t^{-1} \exp\left[-\frac{\alpha^2}{2} \ln^2(\lambda t)\right] \text{ con } \phi \text{ F. D. P. } N(0, 1) \quad (3.47)$$

$$\text{b) } S(t) = 1 - \phi[\alpha \ln(\lambda t)] \quad (3.48)$$

6. Distribución log-logística,  $\text{LogLog}(\lambda, \alpha)$  con  $\lambda, \alpha > 0$  (Ibañez, 2011):

$$\text{a) } f(t) = \lambda \alpha (\lambda t)^{\alpha-1} [1 + (\lambda t)^\alpha]^{-2} \quad (3.49)$$

$$\text{b) } S(t) = \frac{1}{1 + (\lambda t)^\alpha} \quad (3.50)$$

$$\text{c) } h(t) = \frac{\lambda \alpha (\lambda t)^{\alpha-1}}{1 + (\lambda t)^\alpha} \quad (3.51)$$

La estimación de los parámetros de estas distribuciones se hace mediante máxima verosimilitud. Sparling et al. (2006), menciona que los modelos de regresión al igual que en otros métodos estadísticos, pueden plantearse mediante modelos de predicción del tiempo de fallo en función de otras variables potencialmente predictoras. A continuación, se muestran los principales modelos paramétricos de regresión en el análisis de supervivencia. Todos estos modelos expresan la tasa de fallo instantánea en función de las variables predictoras.

a) Modelo de Regresión Exponencial. El modelo de regresión exponencial fue sugerido por Breslow en 1974. En él se supone que los tiempos de vida tienen una distribución exponencial con parámetro  $\lambda$ . Por consiguiente, la función de riesgo es constante y es precisamente  $\lambda$ , la cual depende de un conjunto de variables regresoras (Godínez y Ramírez, 2003). Si  $T \sim \text{Exp}(\lambda)$  con  $\lambda > 0$ , la tasa de fallo instantánea es constante respecto del tiempo. El modelo se encuentra en función de una combinación lineal de las  $d$  variables predictoras  $X$ .

$$h(t|x) = h_0(t) \exp(x^t \beta) = \lambda \exp(x^t \beta) = \lambda \exp(\beta_1 x_1 + \dots + \beta_d x_d) \quad (3.52)$$

La función  $h_0(t)$  se denomina función de riesgo base, correspondiente a valores nulos de las covariantes.

$$\ln[h(t|x)] = \ln(\lambda) + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_d x_d \quad (3.53)$$

Las covarianzas se comportan de forma multiplicativa sobre la tasa de fallo instantánea y de forma aditiva sobre el logaritmo de dicha tasa.

$$S(t|x) = \{-h(t|x)t\} = \exp\{\lambda t e^{\beta_1 x_1 + \dots + \beta_d x_d}\} \quad (3.54)$$

b) Modelo de tiempo de fallo acelerado. Es un modelo de regresión log-lineal para  $T$  donde se modela  $W$  como función lineal de las variables explicativas  $X$ .

$$W = \ln(T) = x^t \beta + Z^* \quad (3.55)$$

$Z^*$  con cierta distribución. Así,  $\exp\{x^t \beta\}$  actúa como un factor multiplicativo en el tiempo de supervivencia  $T$ .

$$T = \exp\{x^t \beta\} \exp\{Z^*\} = \exp\{x^t \beta\} T^* \quad (3.56)$$

para  $T^* = \exp\{Z^*\}$

El tiempo transformado  $T^* = \exp\{Z^*\}$  dispone de una función de riesgo  $h_0^*(t^*)$ , que es independiente de las covariantes o variables explicativas (Coppini et al. 2000).

c) Modelo de riesgos proporcionales de Cox. El modelo de regresión de Cox (1972) es usado para datos de supervivencia en área médica, en este modelo el riesgo para el  $i$ -ésimo individuo se define mediante:

$$\lambda(t; Z_i(t)) = \lambda_0(t) e^{\beta \cdot Z_i(t)} \quad (3.57)$$

Donde  $Z_i(t)$  es el vector de covariables para el  $i$ -ésimo individuo en el tiempo  $t$ . Se dice que es un modelo semiparamétrico debido a que incluye una parte paramétrica y otra no paramétrica:

- i. La parte paramétrica es  $r_i(t) = e^{\beta Z_i(t)}$ , llamada puntaje de riesgo y  $\beta$  es el vector de parámetros de la regresión.
- ii. La parte no paramétrica es  $\lambda_0(t)$ , llamada función de riesgo base y es una función arbitraria no especificada.

El modelo de regresión de Cox, es también llamado modelo de riesgos proporcionales debido a que el cociente entre el riesgo para dos sujetos con el mismo vector de covariables es constante sobre el tiempo, es decir:

$$\frac{\lambda(t; Z_i(t))}{\lambda(t; Z_j(t))} = \frac{\lambda_0(t)e^{\beta Z_i(t)}}{\lambda_0(t)e^{\beta Z_j(t)}} = \frac{e^{\beta Z_i(t)}}{e^{\beta Z_j(t)}} \quad (3.58)$$

Si ha ocurrido una muerte en el tiempo  $t^*$ , entonces la verosimilitud de que la muerte le ocurra al  $i$ -ésimo individuo y no a otro es:

$$L_i(\beta) = \frac{\lambda_0(t^*)r_i(t^*)}{\sum_j Y_j(t^*)\lambda_0(t^*)r_j(t^*)} = \frac{r_i(t^*)}{\sum_j Y_j(t^*)r_j(t^*)} \quad (3.59)$$

El producto  $L(\beta) = \prod L_i(\beta)$  se llama la verosimilitud parcial y fue introducida por Cox en 1972, la maximización de  $\log(L(\beta))$  da una estimación para  $\beta$  sin necesidad de estimar el parámetro ruido  $\lambda_0(t)$  (Borges, 2005).

### 3.5.1. Relación Vida Esfuerzo.

La relación existente entre la vida y el esfuerzo no siempre es el mismo, este puede ser constante o no. Ortega et al. (2015) mencionan que las variables de aceleración más común son la temperatura, voltaje y presión, dependiendo de éstas se aplica una relación vida esfuerzo específica, por ejemplo, si el esfuerzo es temperatura, la relación usual es la de Arrhenius, aunque cabe aclarar que ésta no siempre se aplica en situaciones donde la variable de aceleración es temperatura ya que en algunos casos no se tiene un buen ajuste del modelo. Algunas aplicaciones de esta relación son: aislantes eléctricos y dieléctricos, estados sólidos y semiconductores, celdas de batería, lubricantes, plásticos, lámparas incandescentes, alimentos, etcétera.

Si el esfuerzo aplicado en la prueba es voltaje, la relación más común es la de potencia inversa.

En cualquier caso, se necesita el uso de una distribución de prueba de vida, dependiendo de la distribución utilizada, se tiene los modelos para pruebas de vida acelerada, por ejemplo, si la relación es potencia inversa y se usa la distribución Weibull, se tiene el modelo potencia inversa Weibull. Se han realizado investigaciones previas para determinar el tiempo de vida en alimentos donde el esfuerzo utilizado es la temperatura y la distribución de vida que se emplea es la lognormal, por lo que se usa el modelo Arrhenius-lognormal (Piña, 2015).

### **3.5.2. Linealización de las Funciones de Confiabilidad.**

Este procedimiento es realizado con dos objetivos principales, seleccionar la distribución de probabilidad que mejor modele los tiempos de fallo. En este caso la distribución más adecuada produce gráficos aproximadamente lineales y verificar indicios de violación de la igualdad de los parámetros de escala del modelo de regresión.

Una cantidad grande de modelos paramétricos son utilizados en el análisis de datos de tiempo de fallo. Pero algunas distribuciones de probabilidad ocupan un papel importante en esta clase de modelos, en esta investigación se hace énfasis en las distribuciones exponencial, weibull y la lognormal, como las más útiles en la práctica de análisis de datos acelerados.

### **3.5.3. Distribución Exponencial.**

En la distribución gamma cuando el parámetro  $\alpha$  toma un valor entero positivo, se llama distribución Erlang. Cuando ese entero positivo es igual a uno ( $\alpha = 1$ ), la distribución de Erlang se reduce a la distribución exponencial, siendo un caso especial de distribución gamma. La distribución exponencial es utilizada para determinar la probabilidad de que en cierto tiempo suceda un determinado evento. En Arrollo et al. (2014), se define que una variable aleatoria  $X$  tiene una distribución exponencial si su función de densidad está dada por:

$$f(x, \lambda) = \begin{cases} \lambda e^{-\lambda x}, & \text{si } x > 0; \lambda > 0 \\ 0, & \text{de otra manera} \end{cases} \quad (3.60)$$

Donde  $\lambda$  es igual a  $\frac{1}{\beta}$ .

De esta manera, se puede interpretar a la distribución exponencial como el lapso que transcurre hasta el primer evento de Poisson. Las aplicaciones de la distribución exponencial son situaciones en donde se aplica la metodología de Poisson. Cabe destacar, que la distribución de Poisson es una distribución con un solo parámetro  $\lambda$ , donde  $\lambda$  representa un número medio de eventos por unidad de tiempo. Si la variable aleatoria  $X$  descrita por el tiempo que se requiere para que ocurra el primer evento en una distribución de Poisson, se encuentra que la probabilidad de que no ocurra algún evento en un periodo hasta el tiempo  $t$ , descrita en la ecuación 3.61.

$$p(0, \lambda t) = P(X = 0) = \frac{e^{-\lambda t} (\lambda t)^0}{0!} = e^{-\lambda t} \quad (3.61)$$

Si  $X$  es el tiempo para primer evento de Poisson, la probabilidad de que la duración del tiempo hasta que el primer evento exceda  $x$  es la misma probabilidad de que no ocurra un evento Poisson en  $x$ , dado por  $e^{-\lambda t}$  da como resultado lo expresado en la ecuación 3.62.

$$P(X \geq x) = e^{-\lambda t} \quad (3.62)$$

Así la función de distribución acumulada para  $X$  está dada por

$$P(0 \leq X \leq x) = 1 - e^{-\lambda t} \quad (3.63)$$

Con la finalidad de reconocer la presencia de la distribución exponencial, se diferencia la función de distribución acumulada (Ecuación 3.62) para obtener la función de densidad.

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad (3.64)$$

Que es la función de densidad de la distribución exponencial con  $\lambda = \frac{1}{\beta}$  (Walpole, 2007).

#### 3.5.4. Distribución Weibull.

La distribución Weibull es una distribución continua y tripamétrica, es decir, está completamente definida por tres parámetros y es la más empleada en el campo de la confiabilidad. El uso de la distribución de Weibull en confiabilidad se debe a la gran diversidad de formas que este modelo puede tomar, dependiendo de los valores de los parámetros característicos, esto permite usar un mismo modelo independientemente de la forma en que varíe la tasa de fallos del componente o artículo estudiado, simplificando la tarea de análisis de los resultados (Quiñonez et al. 2015).

La distribución de Weibull es un modelo estadístico que representa la probabilidad de fallo después de un tiempo  $t(R(t))$  en función del tiempo transcurrido o de una variable análoga, es decir,  $R(t)$  es la probabilidad de que los componentes de un conjunto sobrevivan hasta el momento  $t$ . Esta función de fallo o función de fiabilidad  $R(t)$ , esta dada por:

$$R(t) = \exp \left[ - \left( \frac{t - \gamma}{\alpha} \right)^\beta \right] \quad (3.65)$$

Donde;

- i.  $\alpha$ , es el parámetro de escala o vida característica. Este parámetro representa el tiempo y entre mayor sea  $\alpha$ , mayor será el intervalo de tiempo en que se producirán los fallos.
- ii.  $\gamma$ , es el parámetro de translación, se usa cuando no se producen fallos en un periodo de tiempo  $t$  y a partir de ese instante la fiabilidad del producto se puede aproximar a la distribución Weibull (caso  $\gamma > 0$ ); o cuando hay fallos antes de empezar los ensayos (caso  $\gamma < 0$ ).

- iii.  $\beta$ , es el parámetro de forma o perfil y determina la forma de la distribución. En la representación gráfica del modelo, este parámetro coincide con la pendiente de la recta y da una idea de la dispersión de la muestra.

A partir de  $R(t)$  se puede definir la probabilidad de que un componente falle antes del momento  $t$ , que se indica como  $F(t)$ . Esta función es útil en estudios de confiabilidad y se representa como:

$$F(t) = 1 - R(t) \tag{3.66}$$

También se puede definir la función de densidad de probabilidad  $f(t)$ , que muestra la probabilidad que tiene un componente o artículo de fallar en un tiempo dado. Esta coincide con la derivada temporal de  $F(t)$  y su expresión es la que se muestra en la ecuación 3.67 (Bueno y Bevilacqua, 2011).

$$f(t) = \frac{\partial F(t)}{\partial t} = \frac{\beta}{\alpha^\beta} t^{\beta-1} \exp \left[ -\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \right] \tag{3.67}$$

### 3.5.5. Distribución Lognormal.

Cordon y García (2016) mencionan que el tiempo  $T$  desde el origen hasta el evento no tiene una distribución simétrica y su rango de variación es entre 0 y el máximo tiempo posible. Por ello la distribución normal no es apropiada para describir el fenómeno al poder tomar valores negativos. Puede suceder que, aunque los tiempos  $T$  no sean normales, el logaritmo de los tiempos sí siga una distribución normal. Así se define como modelo lognormal aquel en el que los tiempos de supervivencia sigan una distribución normal con media  $\beta$  y desviación típica  $\sigma$ .

En este caso los valores de los tiempos de los casos perdidos en el origen no pueden ser asumidos ya que  $\log t$  no está definido cuando  $t=0$ .

La supervivencia se ha definido como  $1 - F(t)$  donde  $F(t)$  es la función de la variable aleatoria  $T$ , que no es más que la probabilidad acumulada de que el tiempo de supervivencia sea menor o igual que  $t$ . Esta probabilidad es lo mismo que obtener la probabilidad de que la distribución normal de  $\text{Log}(T)$  sea menor que  $\log(t)$ , es decir:

$$F(t) = \Phi\left(\frac{\text{Log } t - \beta}{\sigma}\right) \quad (3.68)$$

Donde  $\Phi$  es la distribución normal estándar  $N(0,1)$ .

Así la supervivencia se obtiene como:

$$S(t) = 1 - F(t) = 1 - \Phi\left(\frac{\text{Log } t - \beta}{\sigma}\right) \quad (3.69)$$

A partir de la relación que existe entre la supervivencia y la tasa de riesgo instantánea se puede obtener esta como el cociente entre la densidad de la distribución y la supervivencia  $h(t) = \frac{f(t)}{S(t)}$ . Así la tasa de riesgo es:

Este tipo de distribución es apropiada para períodos de incubación de enfermedades infecciosas y crónicas como por ejemplo el SIDA.

La tasa de riesgo acumulada a partir de la relación con la supervivencia acumulada  $H(t) = -\log[S(t)]$ .

$$H(t) = -\log[S(t)] = -\log\left[1 - \Phi\left(\frac{\text{log } t - \beta}{\sigma}\right)\right] \quad (3.70)$$

### 3.5.6. Distribución Beta Generalizada.

González et al. (2014), en estudio de sobrevivencia publica que la distribución beta representa una familia de distribuciones de probabilidad continuas con soporte en el intervalo (0,1). La densidad beta es caracterizada por dos parámetros positivos, indicados generalmente por  $\alpha$  y  $\beta$  ó  $u$  y  $v$ , que son parámetros de localización y de escala. La distribución beta ha sido aplicada para modelar el comportamiento de variables aleatorias limitadas a intervalos de amplitud finita, en una gran variedad de áreas.

Su función de densidad de probabilidad es:

$$f(x) = \frac{\Gamma(u+v)}{\Gamma(u)\Gamma(v)} (x)^{u-1} (1-x)^{v-1}; x \in (0,1) \quad (3.71)$$

Puede tener variados comportamientos dependiendo de los valores de los parámetros, desde comportamientos simétricos hasta totalmente asimétricos.

La distribución beta generalizada nació de manera natural para dar mayor flexibilidad al soporte acotado, donde su función de densidad es definida como:

$$f(x) = \frac{\Gamma(u+v)}{h^{u+v-1}\Gamma(u)\Gamma(v)}(x-a)^{u-1}(h-x)^{v-1}; x \in (a, a+h) \quad (3.72)$$

Donde, del mismo modo que en el modelo estándar, los parámetros  $u$  y  $v$  son positivos. Si  $X$  es una variable aleatoria con distribución Beta Generalizada, entonces la notación será  $X \sim BG_a(u, v)$  o equivalentemente  $X \sim BG_{(u,v,a,b)}$ .

Los siguientes elementos son los que generalmente son presentados el análisis y comparar evasiones.

i. Esperanza

$$E(X) = \frac{u}{u+v}h + a \quad (3.73)$$

ii. Segundo Momento

$$E(X^2) = \frac{(u+1)u}{(u+v+1)(v+u)}h^2 + \frac{u}{u+v}2ah + a^2 \quad (3.74)$$

iii. Varianza

$$Var(X) = \frac{(u+1)u}{(u+v+1)(v+u)}h^2 + \frac{u^2}{(u+v)^2}h^2 \quad (3.75)$$

### 3.5.7. Distribución Gamma.

Este modelo es una generalización del modelo Exponencial ya que, en ocasiones, se utiliza para modelar variables que describen el tiempo hasta que se produce  $p$  veces un determinado suceso, su función de densidad es:

$$f(x) = \begin{cases} \frac{1}{\beta^p \Gamma(\alpha)} e^{-\frac{x}{\beta}} x^{\beta-1} & \text{si } x > 0 \\ 0 & \text{si } x \leq 0 \end{cases} \quad (3.76)$$

Como se observa, este modelo depende de dos parámetros positivos:  $\alpha$  y  $\beta$ . La función  $\Gamma(\alpha)$  es la denominada Función Gamma de Euler que representa la ecuación 3.77:

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^{\infty} x^{\alpha-1} e^{-x} dx \quad (3.77)$$

Que verifica  $\Gamma(p+1) = p\Gamma(p)$ , con lo que, si  $p$  es un número entero positivo,  $\Gamma(\alpha+1) = \alpha!$

Dentro de las propiedades de la distribución Gamma están:

1. Su esperanza matemática es  $\alpha\beta$
2. Su varianza es  $\alpha\beta^2$
3. La distribución Gamma,  $\beta, \alpha = 1$  es una distribución Exponencial de parámetro  $\beta$ .
4. Es decir, el modelo Exponencial es un caso particular de la Gamma con  $\alpha = 1$ .
4. Dadas dos variables aleatorias con distribución Gamma y parámetro  $\alpha$  común.

$$X \sim G(\alpha, p_1) \text{ y } Y \sim G(\alpha, p_2)$$

Se cumplirá que la suma también sigue una distribución Gamma.

$$X + Y \sim G(\alpha, p_1 + p_2).$$

Una consecuencia inmediata de esta propiedad es que, si tenemos  $k$  variables aleatorias con distribución exponencial de parámetro  $\alpha$  (común) e independientes, la suma de todas ellas seguirá una distribución  $G(\alpha, k)$  (Kara et al. 2017).

Los modelos estadísticos más utilizados para el análisis de la supervivencia son los no paramétricos y dentro de ellos están el Método Kaplan-Meier, LogRank y Regresión de Cox.

### **3.5.8. Método Kaplan-Meier.**

El método Kaplan-Meier calcula la supervivencia cada vez que un paciente muere. Y da proporciones exactas de supervivencia debido a que utiliza tiempos de supervivencia precisos.

Este método se conoce como el límite-producto. Caracterizándose porque la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos.

La probabilidad de ser censurado debe ser independiente del efecto de interés. Es decir, no puede aplicarse el método de Kaplan Meier (Tineo et al. 2016).

### **3.5.9. Logrank Test.**

El *logrank test* es un método para comparar la supervivencia de grupos, que incluye todo el periodo de seguimiento y no la sobrevive en un punto arbitrario de las curvas. Otra ventaja es que no requiere tener conocimiento sobre el comportamiento o la forma de las curvas o de la distribución de las mismas. El *logrank test* tiene como hipótesis nula que no existe diferencia entre las poblaciones para la ocurrencia de un evento en ningún momento de seguimiento. El análisis es basado en el tiempo de los eventos de cada grupo que se comparan con el número esperado de eventos sino hubiera diferencias entre los grupos (Arribalzaga, 2007).

### **3.5.10. Modelo de Riesgos Proporcionales (Regresión de Cox).**

El modelo de riesgos proporcionales de Cox (MRPC) constituye un modelo multivariado que puede ponderar un efecto de algunas series de variables cualitativas y cuantitativas sobre un desenlace dicotómico a través del tiempo.

Al hablar de supervivencia gran parte del ejercicio clínico relacionado con la atención médica, la toma de decisiones implica el conocimiento del curso clínico de la enfermedad, es decir, la estimación del tiempo transcurrido hasta que un evento suceda (Pérez et al. 2014).

El modelo de regresión más utilizado en análisis de supervivencia es el MRPC, dada su flexibilidad y dado que, al momento de interpretar coeficientes resulta ser más

simple que el resto de los modelos propuestos. Este modelo trabaja principalmente con la función de riesgo (*hazard function*) y es utilizado para detectar relaciones existentes entre el riesgo que se produce en un determinado individuo en un estudio y algunas variables independientes y explicativas; por lo que este modelo permite evaluar dentro de un conjunto de variables cuales tienen relación, sobre la función de riesgo y la función de supervivencia, ya que ambas funciones están conectadas.

Según Flores et al. (2008), el análisis de supervivencia es un área estadística donde la variable de respuesta es el tiempo que transcurre entre un evento inicial (la inclusión del individuo en el estudio) y un evento final (llamado falla) y ocurre cuando el individuo presenta características para terminar el estudio (muerte, alta de la enfermedad, etc.).

Este modelo se ha convertido en uno de los métodos más utilizados, siendo los temas relacionados como la salud, una de las áreas en las que se ha tenido mayor aplicación, es particularmente útil para comparar grupos en los que se estudia el tiempo transcurrido hasta la ocurrencia de un evento, pudiendo analizar conjuntamente el efecto de varias variables (Pérez et al. 2014)

La función de riesgo en este modelo se muestra en seguida:

$$h(t|x) = h_0(t)\exp(x'\beta) \quad (3.78)$$

Se cuenta con un modelo semiparamétrico ya que el riesgo basal,  $h_0(t)$  puede tomar cualquier forma. Las covariables entran a través de un modelo lineal con sus correspondientes parámetros en dos puntos diferentes  $x_1$  y  $x_2$ , la proporción de riesgo para dichas observaciones son:

$$\frac{h(t|x_1)}{h(t|x_2)} = \frac{h_0(t) \exp(x_1'\beta)}{h_0(t) \exp(x_2'\beta)} = \frac{\exp(x_1'\beta)}{\exp(x_2'\beta)} = \exp[(x_1' - x_2')\beta] \quad (3.79)$$

La ecuación 3.79 es conocida como hipótesis de riesgos proporcionales o razón de riesgos. Se puede observar que es constante e independiente al tiempo  $t$ , por ello, el modelo también es conocido como modelo de riesgos proporcionales.

Así, la función de supervivencia está dada por:

$$\begin{aligned} S(t|x) &= \exp\left(-\int_0^t h(u|x)du\right) = \exp\left(-\exp(x'\beta) \int_0^t h_0(u)du\right) \\ &= \left(\exp\left(-\int_0^t h_0(u)du\right)\right)^{\exp(x'\beta)} = (S_0(t))^{\exp(x'\beta)} \end{aligned} \quad (3.80)$$

Mientras que la función de densidad de probabilidad de  $t$  dado  $x$  es:

$$f(t|x) = h_0(t)\exp(x'\beta)(S_0(t))^{\exp(x'\beta)} \quad (3.81)$$

Dentro de este modelo encontramos dos generalizaciones importantes:

- a)  $h_0(t)$  puede permitir que varíen los datos específicos en su subconjunto.
- b)  $x$  puede depender del tiempo, es decir  $x = x(t)$ .

### 3.5.10.1. Estimación.

En seguida se describe como obtener las estimaciones de los parámetros del MRPC  $\beta = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p)^t$  mediante máxima verosimilitud.

En el MRPC, se emplea la función de verosimilitud parcial, dado que la fórmula de probabilidad sólo considera probabilidades para aquellos sujetos u objetos que mueren, fallan o perecen y no considera probabilidades para aquellos sujetos u objetos que son censurados. Sin embargo, en el cálculo de las probabilidades de tiempos de muerte si se consideran los sujetos objeto de riesgo al inicio de los diferentes tiempos de muerte. La verosimilitud parcial se puede expresar como el resultado de diversas probabilidades.

$$L = (L_1)(L_2) \dots (L_K) = \prod_{j=1}^K L_j \quad (3.82)$$

El MRPC propone una verosimilitud parcial para evitar la presencia de las funciones  $h_0(\cdot)$  y  $H_0(\cdot)$ . Se parte de la idea de que los tiempos asociados a datos censurados ( $\delta_1 = 0$ ) no aportan información sobre tiempos de fallo. Si no existen coincidencias de fallos, se considerarán los tiempos de fallos observados ordenados:

$$t_1 < t_2 < \dots < t_D \quad (3.83)$$

Con sus covariantes respectivas asociadas  $x_{(1)}, x_{(2)}, \dots, x_{(D)}$ . Sea  $R(t_i)$  un conjunto de individuos en situación de riesgo en el instante de  $i$ -ésimo fallo, incluyendo los casos censurados, con censura mayor que  $t_i$ :

- a) Suceso “sobrevivir hasta el instante  $t_i$ ”  $\equiv V_i$
- b) Suceso “entre los casos  $R(t_i)$  en riesgo hay un fallo en  $t_i$ ”  $\equiv M_i$
- c) Suceso “un individuo con  $X = x_i$  falla en el instante  $t_i$ ”  $\equiv A_i$

Así, la verosimilitud parcial del  $i$ -ésimo individuo que falla es:

$$\begin{aligned} L_i^* &= \Pr \left[ \frac{A(x_i, t_i)}{V(t_i) \cap M(t_i)} \right] = \Pr \left[ \frac{A_i}{V_i \cap M_i} \right] \\ &= \frac{\Pr[A_i \cap V_i \cap M_i]}{\Pr[V_i \cap M_i]} =^{(1)} \frac{\Pr[A_i \cap V_i]}{[A_i \cap M_i]} \\ &= \frac{\Pr[A_i/V_i] \Pr[V_i]}{\Pr[M_i/V_i] \Pr[V_i]} =^{(2)} \frac{\Pr[A_i/V_i]}{\Pr[M_i]} \\ &= \frac{h(t_i/x_i, \beta)}{\sum_{j \in R(t_i)} h(t_i/x_i, \beta)} = \frac{h_0(t_i) \exp\{x_{(i)}^t \beta\}}{\sum_{j \in R t_i} h_0(t_i) \exp\{x_i^t \beta\}} \\ &= \frac{\exp\{x_i^t \beta\}}{\sum_{j \in R t_i} \exp\{x_i^t \beta\}} \end{aligned} \quad (3.84)$$

(1) Donde  $A_i \cap M_i = A_i$

(2) Dado que  $V_i$ ,  $M_i$  son independientes.

La expresión mostrada en la ecuación 3.84 puede ser considerada como una verosimilitud parcial que no depende de la función de riesgo base. La verosimilitud parcial conjunta de la muestra está dada por la ecuación 3.85.

$$L^*(\beta) = \prod_{i=1}^D L_i^* = \prod_{i=1}^D \frac{\exp\{x_i^t \beta\}}{\sum_{j \in R_{t_i}} \exp\{x_j^t \beta\}} \quad (3.85)$$

Y la log-verosimilitud parcial está definida por la ecuación 3.86:

$$l^*(\beta) = \ln L^*(\beta) = \sum_{i=1}^D \left[ x_i^t \beta - \ln \left( \sum_{j \in R_{t_i}} \exp\{x_j^t \beta\} \right) \right] \quad (3.86)$$

Así, los estimadores de máxima verosimilitud de  $\beta$  se obtiene maximizando la función log-verosimilitud parcial, aplicando el método de Newton-Raphson, y es llevado a cabo mediante derivadas parciales y resolviendo un sistema de ecuaciones:

$$\hat{\beta}: \frac{\partial l^*(\beta)}{\partial \beta} = 0 \quad (3.87)$$

A partir de estos estimadores, se aplican *test* de razón de verosimilitud, *test* de Wald y *test* de Score, basándose en la propiedad asintótica.

$$\hat{\beta} \sim^{\alpha} N_p(\beta, \Phi^{-1}(\beta)) \quad (3.88)$$

Siendo  $\Phi(\beta)$ :

$$\Phi(\beta) = \frac{\partial^2 l^*(\beta)}{\partial \beta \partial \beta^t} \quad (3.89)$$

Si existen coincidencias en los tiempos de fallo, se aplicará alguno de los siguientes métodos: Método de Breslow, Método de Efron, Método “*Exact partial likelihood*”.

Sea:

- a)  $U_i$  el conjunto de individuos que fallan en el instante  $t_i$ .
- b)  $m_i$  la multiplicidad de  $t_i$ , es decir, el número de fallos en el instante  $t_i$ .  $m_{(i)} = \text{card}\{U_i\}$
- c)  $r_i = \text{card}\{Rt_i\}$
- d)  $z_i = \sum_{j \in U_i} x_i$

Si el tiempo es continuo, las multiplicidades son pequeñas o iguales a 1. En este caso se pueden aplicar los siguientes métodos.

a) Método de estimación de las funciones de supervivencia de línea base. La estimación de los parámetros en el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox se lleva a cabo aplicando el método de máxima verosimilitud parcial propuesto por Cox con la correlación de Breslow, para los casos en que se haya producido más de un evento en más de un determinado momento (Cordón y García 2016). De esta manera, se considera que el método de verosimilitud parcial efectúa la estimación en base al producto de las verosimilitudes de todos los cambios ocurridos.

$$L_B^*(\beta) = \prod_{i=1}^D \frac{\exp\{z_i^t \beta\}}{[\sum_{j \in Rt_i} \exp\{x_i^t \beta\}]^{m_{(i)}}} \quad (3.90)$$

b) Método de Efron. En 1979, Bradley Efron desarrolla y publica un análisis formal de *Bootstrap*. El nombre *bootstrapping* fue usado por Efron para seguir las ideas de Tukey en 1958, quien usó el nombre de *jackknifing* para describir su método de remuestreo (Tineo et al. 2006). Maximiza la verosimilitud:

$$L_E^*(\beta) = \prod_{i=1}^D \frac{\exp\{z_{(i)}^t \beta\}}{\prod_{l=1}^{m_{(i)}} \left[ \sum_{j \in Rt_i} \exp\{x_i^t \beta\} - \frac{j-1}{m_{(i)}} \sum_{j \in U_i} \exp\{x_i^t \beta\} \right]} \quad (3.91)$$

Cuando los tiempos son observados en tiempo discreto, los empates son empates verdaderos, es decir, los fallos pasan realmente en el mismo instante de

tiempo. Cox (1975) propone este caso mostrado en la ecuación 3.92. Asumiendo que las fallas ocurren en momentos distintos  $t_{(1)} < \dots < t_{(m)}$ . Si el conjunto de riesgo en el tiempo  $t_j - 0$ , que es el conjunto de individuos que no han fallado ni han sido censurados en ese momento,  $z_k$  denotará el valor de  $z$  para el  $k$ -ésimo individuo y  $z_{(j)}$  es el valor para el individuo que falla en el momento  $t_{(j)}$ .

$$\prod_j \frac{\exp(\beta^t z_{(j)})}{\sum_{K \in R_j} \exp(\beta^t z_k)} \quad (3.92)$$

Donde  $R_j$  es el conjunto de los subconjuntos de sujetos que pueden formarse con los incluidos en el conjunto de riesgo  $R(t_j)$ . En la estimación de la función de riesgo base, el MRPC es considerado como un modelo semiparamétrico porque la función de riesgo base  $h_0(t)$  se estima de forma no paramétrica. En resumen, se usa solo la función con valores no nulos en los tiempos de fallo observados, y así  $h_0(t)$  será una función escalonada.

$$(y_j, \delta_j): j = 1, \dots, n: \begin{cases} \text{si } \delta_i = 1 \rightarrow y_i \text{ tiempo de falla } (t) \\ \text{si } \delta_i = 0 \rightarrow y_i \text{ tiempo de Censura} \end{cases} \quad (3.93)$$

Se considera que los tiempos de fallo (ordenados)  $t_1 < t_2 < \dots < t_D$ , con covariantes asociadas, respectivamente,  $x_1, x_2, \dots, x_D$ . La función de verosimilitud viene dada por:

$$\begin{aligned}
& L(y_1, \dots, y_n; h_0, \beta, x_1, \dots, x_n) \\
&= \prod_{j=1}^n f(y_j)^{\delta_j} S(y_j)^{1-\delta_j} \\
&= \prod_{j=1}^n h(y_j)^{\delta_j} S(y_j) \\
&= \prod_{j=1}^n h(y_j)^{\delta_j} \exp\{-H(y_j)\} \\
&= \prod_{j=1}^n [h_0(y_j) \exp\{x_j^t \beta\}]^{\delta_j} \exp\{-H_0(y_j) \exp\{x_j^t \beta\}\} \\
&= \left[ \prod_{i=1}^n h_0(t_i) \exp\{x_i^t \beta\} \right] \left[ \exp\left\{-\sum_{j=1}^n H_0(y_j) \exp\{x_j^t \beta\}\right\} \right]
\end{aligned} \tag{3.94}$$

Considerando  $h_0(t_i) = h_{0_i}$ ,  $i = 1, \dots, D$ ,  $h_0(t) = 0 \quad \forall t$  no observado, con  $h_{0_i}$  desconocidas, que son estimadas. La función acumulada es:

$$H_0(y) = \sum_{i:t_i \leq y} h_{0_i} \tag{3.95}$$

Así,

$$\begin{aligned}
& L(y_1, \dots, y_n; h_0, x_1, \dots, x_n) \\
&= \left[ \prod_{i=1}^D h_{0_i} \exp\{x_i^t \beta\} \right] \left[ \exp\left\{-\sum_{j=1}^n \exp\{x_j^t \beta\} \sum_{i:t_i \leq y} h_{0_i}\right\} \right] \\
&= \left[ \prod_{i=1}^D h_{0_i} \exp\{x_i^t \beta\} \right] \left[ \prod_{i=1}^D \exp\left\{h_{0_i} \sum_{j:y_j \geq t_i} \exp\{x_j^t \beta\}\right\} \right]
\end{aligned}$$

Dado que;

$$\{j: y_j \geq t_i\} = \{j: j \in R(t_i)\} = R(t_i)$$

$$L(y_1, \dots, y_n; h_0, x_1, \dots, x_n) = \prod_{i=1}^D \left[ h_{0_i} \exp\{x_i^t \beta\} \exp \left\{ -h_{0_i} \sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \beta\} \right\} \right]$$

Considerando a  $\beta$  como estimador de máxima verosimilitud parcial obtenido anteriormente y tomando logaritmos, se tiene la ecuación 3.94:

$$l(h_0) = \sum_{i=1}^D \ln(h_{0_i}) + x_i^t \hat{\beta} - h_{0_i} \sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \hat{\beta}\} \quad (3.96)$$

La estimación de los valores  $h_{0_i}$   $i = 1, \dots, D$  se puede obtener maximizando la ecuación log-verosimilitud:

$$\frac{\partial}{\partial h_{0_i}} = \frac{1}{h_{0_i}} - \sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \hat{\beta}\} = 0 \Rightarrow \hat{h}_{0_i} = \frac{1}{\sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \hat{\beta}\}} \quad (3.97)$$

$$\hat{H}_0(y) = \sum_{i: t_i \leq y} \hat{h}_{0_i} = \sum_{i: t_i \leq y} \frac{1}{\sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \hat{\beta}\}} \quad (3.98)$$

En caso de empate, se usa el método de Nelson-Aalen-Breslow:

$$\hat{H}_0(y) = \sum_{i: t_i \leq y} \hat{h}_{0_i} = \sum_{i: t_i \leq y} \frac{m_{(i)}}{\sum_{j \in R(t_i)} \exp\{x_j^t \hat{\beta}\}} \quad (3.99)$$

Así,  $\hat{S}_0(y) = \exp[-\hat{H}_0(y)]$  y por lo tanto  $\hat{S}(y) = [\hat{S}_0(y)]^{\exp(x^t \hat{\beta})}$

Los métodos de estimación de esta función no paramétrica son: Método Nelson-Aalen-Breslow y Método Efron.

$$\hat{H}_0(y) = \sum_{i:t_i \leq y} \frac{1}{\sum_{l \in R t_i} \exp\{x_l^t \hat{\beta}\} - \frac{j-1}{m_i} \sum_{l \in U_i} \exp\{x_l^t \beta\}} \quad (3.100)$$

La estimación también se puede complementar con intervalos de confianza, normalmente el procedimiento que se utiliza para obtener un intervalo de confianza al 95% para la influencia de cada variable en la función de riesgo consiste en calcular el exponencial del intervalo de confianza asintótico obtenido para los parámetros o coeficientes del predictor lineal (Kleinbaum y Klein, 2012).

$$IC = \exp \left[ \hat{\beta}_l \pm 1.96 \sqrt{\widehat{Var} \hat{\beta}_1} \right] \quad (3.101)$$

### 3.6. Ajuste de los Modelos de Regresión.

Para interpretar datos de mediciones de degradación bajo una condición acelerada es necesario contar con un modelo que relacione diferentes niveles de esfuerzo de la variable de aceleración, en este caso la temperatura, y los tiempos a la falla para cada nivel de esfuerzo. Con este modelo se pretende extrapolar la información para inferir los tiempos a la falla bajo esfuerzo de uso normal. A partir del comportamiento de los tiempos a la falla en diferentes niveles de estrés.

Según Nelson (2004), los modelos de regresión empleados en el análisis de estrés, son también llamados de localización y escala. Estos modelos son construidos para el logaritmo de tiempo de fallo  $t$ , es decir  $y = \ln(t)$ . La principal característica de estos modelos es que los tiempos de fallo tienen una distribución con parámetro de localización  $\mu(x)$ , que depende de la variable de aceleración  $x$ , y parámetro de escala  $\alpha > 0$  constante.

Los modelos de localización y escala tienen la siguiente forma:

$$y = \mu(x) + \alpha \varepsilon \quad (3.102)$$

donde  $\varepsilon$  es el error aleatorio independiente de  $x$  así  $y = \ln(t)$ . Se puede observar a partir de esta ecuación que el modelo de regresión es lineal para el logaritmo

de los tiempos de fallo. El parámetro de escala  $\alpha$  se obtiene a partir de la distribución de probabilidad del modelo de tiempo de fallo y parámetro de localización  $\mu(x)$  viene dado por un modelo determinista denominado relación aceleración/respuesta. De esta forma los tiempos de fallo  $t$ , son obtenidos por las pruebas aceleradas en la escala original y transformados en la escala logarítmica.

### 3.6.1. Relación Vida Esfuerzo Arrhenius.

Nelson y Labuza (1994) mencionan que la temperatura es una de las variables de aceleración del mecanismo de la falla más comúnmente utilizada, sobre todo cuando implícitamente está involucrada alguna reacción química. La relación vida-esfuerzo Arrhenius es la más ampliamente utilizada cuando el mecanismo de aceleración de la falla es la temperatura. Esta relación describe el efecto que tiene la temperatura en la tasa de una reacción química sencilla. La relación de Arrhenius propone una ecuación simple, pero muy exacta, esta ecuación establece la relación de la tasa de una reacción química y la temperatura. En la relación Arrhenius se menciona que para que los reactivos se puedan transformar en productos, es necesario que adquirieran suficiente energía para formar un complejo activado (Salinas et al. 2007). Este mínimo de energía fue lo que denominó como energía de activación ( $E_a$ ) para la reacción. En una situación de equilibrio térmico, a una temperatura absoluta  $T$ , la fracción de moléculas que tienen una energía cinética mayor que ( $E_a$ ) puede calcularse de la constante de los gases ideales y es proporcional a  $e^{\frac{-E_a}{RT}}$ . Esta expresión nos conduce a la ecuación propuesta por Arrhenius para la tasa de reacción.

$$k = A' \exp[-E_a/(RT)] \quad (3.103)$$

Donde  $k$  es la constante de velocidad de reacción,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $8.314472 \frac{J}{mol \cdot K}$ ,  $E_a$  es la energía de activación en  $\frac{J}{mol}$ ,  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin,  $A$  es el factor pre-exponencial característico del mecanismo de falla del producto cuyas unidades son iguales a la de la constante de velocidad.

Un elemento falla cuando una reacción química alcanza una cantidad crítica, es decir, cuando ha transcurrido un tiempo determinado (tiempo a la falla) a una tasa de reacción determinada se alcanza un nivel de reacción que provoca la falla.

Así:

$$\text{Cantidad Crítica} = (\text{Tiempo de falla})(\text{Tasa de Reacción})$$

$$\text{Tiempo de Falla} = \frac{\text{Cantidad}}{\text{Tasa de Reacción}}$$

De modo que la cantidad crítica de reacción química es una constante, así, el tiempo nominal de falla  $\tau$  (vida) es inversamente proporcional. Esto produce la relación de vida de Arrhenius.

$$\tau = A \exp[E_a/(RT)] \quad (3.104)$$

La ecuación 3.104 indica que el tiempo a la falla dependerá de una constante relacionada con el mecanismo de falla del producto y las condiciones de prueba ( $A$ ) y dependerá de la energía de activación de la reacción de oxidación ( $E_a$ ). A mayor energía de activación, mayor será el tiempo a la falla. Contrariamente, a una temperatura de prueba más alta, el tiempo a la falla se reducirá exponencialmente. Esta es la razón por la cual se transforma de manera logarítmica la escala de vida del modelo de predicción acelerado (Paternina et al. 2018).

### 3.6.1.1. Modelo Arrhenius-Exponencial.

La distribución exponencial es a menudo una aproximación razonable para la distribución de tiempos de falla para un sistema electrónico complejo, sin embargo, a menudo es una aproximación engañosa de la distribución de la vida útil de un componente o material. Este modelo combina la distribución de probabilidad exponencial con la relación de Arrhenius (Nelson, 2004). La aplicación de este modelo implica los siguientes supuestos:

1. A cualquier temperatura absoluta  $T$ , la vida tiene una distribución exponencial,
2. El logaritmo natural de la vida media  $\theta$ , es una función lineal de la inversa de  $T$ .

$$\ln[\theta(T)] = \gamma_0 + (\gamma_1/T) \quad (3.105)$$

Los parámetros del modelo  $\gamma_0$  y  $\gamma_1$ , son característicos del producto y método de prueba. El logaritmo natural de la tasa de falla  $\lambda = 1/\theta$  es:

$$\ln[\lambda(T)] = -\gamma_0 - (\gamma_1/T) \quad (3.106)$$

Estos supuestos provocan la función de distribución acumulada y los percentiles siguientes. Para una temperatura absoluta determinada  $T$ , la función de distribución acumulada para los tiempos de fallo de un producto en el tiempo  $t$  esta dada por la ecuación 3.107:

$$\begin{aligned} F(t; T) &= 1 - \exp\left[-\frac{t}{\theta(T)}\right] = 1 - \exp[-t\lambda(T)] \\ &= 1 - \exp\{-t \exp[-\gamma_0 - (\gamma_1/T)]\} \end{aligned} \quad (3.107)$$

A una temperatura absoluta  $T$ , el percentil es:

$$\tau_p(T) = \theta(T)[- \ln(1 - P)] = \exp[\gamma_0 + \gamma_1(1000/T)][- \ln(1 - P)] \quad (3.108)$$

### 3.6.1.2. Modelo Arrhenius-Weibull.

La vida de algunos productos y materiales en una prueba acelerada de temperatura se describe como una distribución de Weibull. Este modelo combina la distribución de probabilidad de Weibull con la relación Arrhenius (Piña et al. 2015; Bayle y Mettas, 2010). Los supuestos del modelo de Arrhenius-Weibull son:

1. A una temperatura absoluta  $T$ , la vida del producto tiene una distribución de Weibull; de manera equivalente, el logaritmo natural de la vida tiene una distribución de valor extremo.
2. El parámetro de forma  $\beta$  es una constante independiente de la temperatura equivalente, de la distribución de valores extremos del logaritmo natural de la vida teniendo un parámetro de escala constante  $\delta = 1/\beta$ .

3. El logaritmo natural de la vida característica de Weibull  $\alpha$  es una función lineal de la inversa de  $T$ :

$$\ln[\alpha(T)] = \gamma_0 + (\gamma_1/T) \quad (3.109)$$

Los parámetros  $\gamma_0$ ,  $\gamma_1$  y  $\beta$  son característicos del producto y método de prueba; se estiman a partir de datos. Las suposiciones del modelo Arrhenius - Weibull producen una función de distribución acumulada de tiempo de fallo y de los percentiles. Para una determinada temperatura absoluta  $T$ , la función de distribución acumulada para este modelo está dada por la ecuación 3.110.

$$F(t; T) = 1 - \exp\{-[t/\alpha(T)]^\beta\} = 1 - \exp\left\{-[t \exp[-\gamma_0 - (\gamma_1/T)]]^\beta\right\} \quad (3.110)$$

Los valores de los tiempos correspondientes a los percentiles, de acuerdo con la expresión anterior, se muestra por la ecuación 3.111.

$$\tau_p(T) = \alpha(T)[- \ln(1 - P)]^{\frac{1}{\beta}} = \exp[\gamma_0 + \gamma_1(1000/T)][- \ln(1 - P)]^{\frac{1}{\beta}} \quad (3.111)$$

donde  $P$  es el valor de probabilidad dado por la función de distribución acumulada.

### 3.6.1.3. Modelo Arrhenius-Lognormal.

Este modelo combina la distribución de probabilidad Lognormal con la relación de Arrhenius. El modelo Arrhenius-lognormal es usado basado en la experiencia de la ingeniería. El uso de este modelo implica en las siguientes suposiciones (Nelson, 2004).

1. En una temperatura absoluta  $T$ , los tiempos de fallo tienen distribución Lognormal, de manera equivalente el logaritmo de los tiempos de fallo tiene una distribución normal.
2. La desviación estándar  $\sigma$  de la distribución de  $y = \ln(T)$  es constante e independiente de la variable de aceleración (temperatura).
3. El logaritmo de la vida media  $\tau_{0.5}(T)T$  es una función lineal de la inversa de la temperatura absoluta.

$$\log[\tau_{0.5}(T)] = \beta_1 + (\beta_2/T) \quad (3.112)$$

La cual se llama relación de Arrhenius. Los parámetros  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\sigma$  son características del producto y del método de prueba, los cuales son estimados de los datos. La media  $\mu(x)$  del logaritmo de la vida es una función lineal de  $x = 1000/T$ , como se muestra en la ecuación 3.113

$$\mu(x) = \beta_1 + \beta_2 x \quad (3.113)$$

El valor de 1000 se usa como escala de la temperatura. Con lo anterior, a una temperatura absoluta  $T$ , la función de distribución acumulada al tiempo  $t$  se comporta como la ecuación 3.114.

$$F(t) = \phi \left[ \frac{\log(t) - \mu(x)}{\sigma} \right] \quad (3.114)$$

Donde  $\phi[ \ ]$  es la función de distribución acumulada de una normal estándar.

En conclusión, la relación existente entre la vida y el esfuerzo no siempre es el mismo, éste puede ser constante o no, en esta investigación sólo se analizarán pruebas con esfuerzo constante, ya que es más común que las unidades trabajen con el mismo esfuerzo durante el tiempo de la prueba. A niveles altos de esfuerzo (temperatura) la vida disminuye y viceversa. Cuando el tiempo de la prueba se especifica y algunas unidades no han fallado hasta ese momento, se dice que éstas están censuradas o que se tienen datos censurados por la derecha. En esta investigación, las variables de aceleración a usar en esta investigación son la temperatura, tiempo de empaque (humedad dentro del empaque) y pH, por lo cual uno de los modelos usados en las pruebas de vida acelerada es Arrhenius, temperatura-humedad y MRPC. El objetivo principal de las pruebas de vida acelerada es obtener datos de falla más rápidamente sometiendo al producto a ambientes de aceleración superiores a los que normalmente se encuentra. Para extrapolar los datos de falla del producto en condiciones aceleradas,

o de estrés, a condiciones nominales de operación se hace uso de los modelos de aceleración, los cuales cuentan con una función de distribución de probabilidad analizadas anteriormente y con ello se puede obtener el factor de aceleración de las pruebas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

En este capítulo se establece toda la metodología empleada para confirmar la hipótesis y llegar a cabo los objetivos.

### **4.1. Material, Equipo y Reactivos.**

Material:

1. Matraces Erlenmeyers de 100, 250 y 500 mL.
2. Cajas de Petri.
3. Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL.
4. Probetas de 10, 100, 250 mL.
5. Vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 mL.
6. Espátula.
7. Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
8. Escobillas lava tubos.
9. Pinza estéril.
10. Micropipetas de 20, 100, 500  $\mu$ L.
11. Horadador
12. Frasco graduado 1000 mL.

Equipo:

1. Autoclave.
2. Balanza analítica.
3. Parrilla eléctrica.
4. Estufa de cultivo.
5. Mechero de Bunsen.
6. Incubadora Automática.
7. Refrigerador.

8. Software Image tool<sup>®</sup>
9. Software Minitab 18<sup>®</sup>
10. Software SPSS Statistics 22<sup>®</sup>
11. Computadora personal en ambiente Windows<sup>®</sup>

Reactivos:

1. Aceites esenciales de Tomillo, Clavo de olor y Hierba limón.
2. Agua destilada Estéril.
3. Agar papa dextrosa.
4. Caldo Nutritivo.
5. Propionato de sodio.
6. Acido Fumárico.

Para poder determinar el tiempo de vida de la tortilla de maíz es necesario determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón que evite el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* a través de un medio de cultivo.

## **4.2. Métodos.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón frente a cepas de *Aspergillus flavus*, se utilizó la técnica de difusión en agar con diluciones.

### **4.2.1. Preparación del Inóculo.**

Para la preparación del inóculo se utiliza cepas del hongo *Aspergillus flavus*, el cual es conservado en placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA). Las placas con agar sembradas con el hongo se extraen con un asa de uso bacteriológico, tomando una colonia aislada del hongo, para ser transferido a una nueva caja de Petri que contendrán 30 ml de solución de agar papa dextrosa, se deja reposar el hongo a una temperatura de 28°C por cinco días.

#### 4.2.2. Preparación de PDA.

Por cada 100 ml de agua purificada, se pesan aproximadamente 3.9 gr. de agar papa dextrosa y se disuelven en una botella graduada para medio de cultivo con tapa de 500 ml, se calienta en una parrilla eléctrica hasta desaparecer grumos y hasta llegar al punto de ebullición (se deja hervir por un minuto). Se esteriliza la solución en una autoclave a 121 Pa. por 15 min. Transcurrido el tiempo se enfría la solución hasta llegar aproximadamente a 50°C.

#### 4.2.3. Preparación de PDA con Aceites Esenciales en Concentraciones de 2%, 1% y 0.5% y Crecimiento Radial (Experimento General).

Para una concentración de 0.5% de aceite esencial; en una campana de flujo laminar vertical previamente desinfectada y con ayuda de una micropipeta se toman aproximadamente 1.5 ml de aceite esencial de Clavo de Olor y se colocan en un tubo de centrifuga graduado y se adiciona la solución de PDA previamente preparada hasta aforar a 30 ml, se mezcla la solución y se pasa a cajas de Petri y se deja gelificar la solución, lo mismo se hace para los diferentes tipos de aceites esenciales y demás concentraciones en este primer experimento (ver tabla 4.1). Para darle mayor certeza al experimento, éste se realiza por triplicado.

Tabla 4.1. Cantidad de Aceite a Diferentes Concentraciones.

	0.5%	1.0%	2.0%
A. E. de Clavo	1.5ml	3 ml	6 ml
A. E. de Hierba Limón	1.5 ml	3 ml	6 ml
A. E. de Tomillo	1.5ml	3 ml	6 ml

Una vez preparadas las cajas de Petri con diferente aceite esencial y diferentes concentraciones, se inocula el hongo *Aspegillus Flavus*, con ayuda de un horador se generan inóculos con un área de 0.44 cm<sup>2</sup> aproximadamente y se inocula cada caja de Petri con ayuda de un asa para siembra. Se sellan las cajas con cinta parafilm y se almacenan en un cuarto a temperatura de 28°C. Se mide el crecimiento de área cada

24 horas con ayuda del *software Image tool*<sup>®</sup>, hasta llegar a 120 horas. También, realizó un experimento de control, el cual no contenía ningún tipo de aceite.

#### 4.2.4. Concentraciones Utilizadas en el Experimento.

Las cajas se incubaron durante 120 horas a 28°C; la actividad antimicrobiana se expresó como la diferencia, en centímetros cuadrados, entre el área del inóculo y el área de crecimiento. El efecto de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón se compararon con una con una prueba de control donde no contenía absolutamente ningún tipo aceite esencial.

Posteriormente se corrieron más pruebas diferentes concentraciones bajo las mismas condiciones, ya que en las concentraciones antes mencionadas en algunos casos no hubo crecimiento (Ver tabla 4.2).

Se miden las áreas de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando *software Image tool*<sup>®</sup>.

Tabla 4.2. Cantidad de Aceite Usado en Diferentes Pruebas.

Concentración	A. Clavo	A. Hierba Limón	A. Tomillo
2.0%	6 ml	6 ml	6 ml
1.0%	3 ml	3 ml	3 ml
0.6%	180 µl		
0.5%	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
0.4%	120 µl	120 µl	120 µl
0.3%	90 µl	90 µl	90 µl
0.2%		60 µl	60 µl
0.1%		30 µl	30 µl
0.09%		27 µl	27 µl
0.08%		24 µl	24 µl
0.07%		21 µl	21 µl

Tabla 4.2. Cantidad de Aceite Usado en Diferentes Pruebas (Continuación).

Concentración	A. Clavo	A. Hierba Limón	A. Tomillo
0.06%		18 µl	18 µl
0.05%		15 µl	15 µl
0.04%			12 µl
0.03%			9 µl
0.02%			6 µl

#### 4.3. Evaluación *In vitro*.

La concentración mínima inhibitoria se determinó mediante el método de dilución de caldo de los aceites a los cuales se les atribuyó actividad fungistática, las concentraciones evaluadas fueron desde; el 2.0% hasta el 0.3% de aceite esencial de Clavo de olor, del 2.0% hasta el 0.05% para el aceite esencial de hierba limón, y del 2% hasta el 0.02% para el aceite esencial de tomillo. La inhibición del crecimiento del micelio se determinó mediante la ecuación 4.1:

$$\%Inhibición = \left[ 1 - \left( \frac{Crecimiento\ en\ el\ Tratamiento}{Crecimiento\ en\ el\ Control} \right) \right] X 100 \quad (4.1)$$

#### 4.4. Evaluación en Tortilla de Maíz.

Se utiliza harina de maíz comercial nixtamalizado, añadiendo aceite esencial de clavo de olor a diferentes porcentajes de concentración (como marca la tabla 4.3). La masa se elabora mezclando 100 g de harina de maíz con 160 ml de agua purificada, previamente, el aceite esencial se agrega en el agua con la que hidrata la harina. La mezcla se amasa hasta no observar presencia de grumos en la masa.

Siguiendo la metodología de la patente de Martínez et al. (1996), se elaboraron discos de masa de aproximadamente 45 gr de masa cada una, con ayuda de una prensa manual, obteniendo tortillas de un diámetro aproximado de 15 cm y un espesor aproximado de 2 mm. Las tortillas se cocinaron en una plancha caliente a una temperatura aproximada de 280°C, cada tortilla se cocinó por 30 segundos

aproximadamente por un lado y 40 segundos del otro lado y finalmente 20 segundos, las tortillas se enfriaron en diferentes tiempos para posteriormente ser empacadas individualmente en bolsas de polietileno que fueron selladas y almacenadas a cierta temperatura. La vida útil de las tortillas se calcula de acuerdo con el procedimiento utilizado por Islam et al. (1984), en el que la referencia es el tiempo en que las tortillas se mantienen sin mostrar rastros aparentes de hongo.

#### **4.5. Determinación de los Niveles Óptimos para la Concentración de Aceite Esencial de Tomillo en Tortilla de Maíz.**

Una vez encontrada la concentración mínima de inhibición de los diferentes aceites esenciales (sección 4.2.4), considerando como el mejor al que usa menos porcentaje de aceite esencial, se crea un diseño central compuesto de superficie de respuesta, donde los factores son la concentración de aceite esencial de tomillo (0.05% - 0.1%) y el tiempo de empaque del producto (0 min-30 min) con tres réplicas cada experimento y a una temperatura de almacenamiento de 28 °C. El diseño creado se muestra en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Diseño de Superficie de Respuesta para Tortillas.

Concentración de Aceite Esencial de Tomillo %	Tiempo de Empaque (min)
0.05	0
0.1	0
0.05	30
0.1	30
0.039	15
0.11	15
0.075	(6.213)
0.075	36.213
0.075	15
0.075	15
0.075	15
0.075	15
0.075	15

#### 4.6. Dependencia de la Temperatura

Como la constante de velocidad de reacción es función de la temperatura, esta dependencia es descrita por la ecuación de Arrhenius. El modelo Arrhenius de primer orden describe la relación de la constante de velocidad de reacción con la temperatura según la ecuación 3.103. Donde  $k$  es la constante de velocidad de reacción,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $8.314472 \frac{J}{mol \cdot K}$ ,  $E_a$  es la energía de activación en  $\frac{J}{mol}$ ,  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin,  $A'$  es el factor pre-exponencial característico del mecanismo de falla del producto cuyas unidades son iguales a la de la constante de velocidad. Así, el tiempo nominal de falla  $\tau$  (vida) es inversamente proporcional. Esto produce la relación de vida de Arrhenius, mostrada en la ecuación 3.104.

$$\tau = A \exp[E_a / (RT)] \quad (3.104)$$

Se cocinaron 10 tortillas para cada tratamiento, tal como lo marca el apartado 4.4. adicionando aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.09%. Posteriormente las tortillas se enfrían a temperatura ambiente por 31 min para después ser empaquetadas individualmente en bolsas de polietileno, que son selladas y almacenadas en una Incubadora Automática marca Hertherm a temperaturas de estrés de 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. El experimento termina cuando aparecen colonias de microorganismos visibles en la tortilla. Para tener un punto de comparación, se realiza el mismo experimento adicionando propionato de sodio como conservante a las tortillas a una concentración del 0.2% y estrazando el producto a las mismas temperaturas.

#### 4.7. Dependencia de la Temperatura-Humedad

Se realizó un diseño de bloques totalmente aleatorizado, donde los factores son la temperatura en 4 niveles (25, 30, 35 y 40 °C) y el tiempo de empaque en 4 niveles (0, 15, 30 y 45 min) con 10 réplicas cada uno.

Se cocinaron 10 tortillas para cada tratamiento, tal como lo marca el apartado 4.4. adicionando aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.09%. Posteriormente las tortillas se enfrían a temperatura ambiente por 0, 15, 30 y 45 min para después ser empaquetadas individualmente en bolsas de polietileno (con ayuda

de un higrómetro se mide la humedad dentro del empaque hasta que se ya no se muestra variación en el equipo), las bolsas son selladas y almacenadas a temperaturas de estrés de 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. El experimento termina cuando aparecen colonias de microorganismos visibles en la tortilla. Para tener un punto de comparación, se realiza el mismo experimento adicionando propionato de sodio como conservante a las tortillas a una concentración del 0.2% y estrazando el producto a las mismas temperaturas y tiempo de empaque.

#### **4.8. Modelo de Riesgo Proporcional de Cox.**

Se realizó un diseño cuadrado latino, donde intervienen los siguientes factores: un factor principal, el pH del agua en 4 niveles (3, 4, 5 y 6) y dos factores secundarios o variables de bloque, que son la temperatura en 4 niveles (25, 30, 35 y 40 °C) y la humedad relativa dentro del empaque (63, 52, 37 y 35 min), con 10 repeticiones cada experimento.

Se cocinaron 10 tortillas para cada tratamiento, tal como lo marca el apartado 4.4, pero modificando el pH del agua con el que son fabrican las tortillas adicionando ácido fumárico hasta medir un pH de 3, 4, 5 y 6, se adicionando aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.09%. Posteriormente las tortillas se enfrían a temperatura ambiente por 0, 15, 30 y 45 min para después ser empaquetadas individualmente en bolsas de polietileno (con ayuda de un higrómetro se mide la humedad dentro del empaque hasta que se ya no se muestra variación en el equipo), las bolsas son selladas y almacenadas a temperaturas de estrés de 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. El experimento termina cuando aparecen colonias de microorganismos visibles en la tortilla. Si consideramos que los tres factores son de efectos fijos, temperatura, humedad y las letras latinas representadas por el pH, 3(A), 4(B), 5(C) y 6(D), el modelo estadístico para este diseño es el mostrado en tabla 4.4.

Tabla 4.4. Cuadrado Latino para Tortilla de Maíz.

		% Humedad			
Temperatura °C	A	B	C	D	
	B	C	D	A	
	C	D	A	B	
	D	A	B	C	

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En este capítulo se presentan los resultados y las discusiones, de los datos obtenidos en la experimentación para así confirmar las hipótesis planteadas anteriormente.

### 5.1. Experimento General.

Como un primer paso en el proceso de experimentación, fue necesario determinar los niveles de concentración mínimos, de los aceites esenciales seleccionados, de manera que fuera posible tener una referencia respecto de la concentración mínima en donde inicia el proceso de crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*, ya que en procesos experimentales subsecuentes es necesario conocer la concentración mínima de inhibición del hongo.

*In vitro* se evaluaron áreas de crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*, con aceite esencial de Clavo de Olor, Hierba Limón y Tomillo en concentraciones de 0.5%, 1.0% y 2.0%, tal como se menciona en el apartado 4.2.3. De las áreas de crecimiento obtenidas y con ayuda de Minitab 18<sup>®</sup> se calcularon los rangos y se evaluó en un análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*, por sus siglas en inglés), como se muestra en la tabla 5.1. Se analiza los bloques que son las repeticiones del experimento en tres niveles, los tres diferentes tipos de aceite esencial y las diferentes concentraciones en 3 niveles, así como el tiempo en cinco niveles.

Tabla 5.1. Análisis de Varianza, Experimento General.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor $p$
Bloques	2	1.7	0.87	0.00	0.996
Aceite Esencial	2	15187.5	7593.75	30.75	0.000
Concentración	2	15187.5	7593.75	30.75	0.000
Tiempo	4	28.5	7.12	0.03	0.998
Error	124	30619.3	246.93		
Total	134	61024.5			

El valor  $p$  calculado para las repeticiones y el tiempo son mayores a 0.05, lo que indica que, no son significativas, no así para la concentración y el tipo de aceite esencial. Se procede a realizar experimentos por separado para cada aceite esencial (Tomillo, Clavo, Hierba limón), considerando el tiempo en horas como los bloques y el porcentaje de concentración de aceite esencial como los tratamientos.

## 5.2. Primer Experimento para Clavo de Olor.

Dado que en las corridas primarias si hubo crecimiento para el aceite esencial de clavo de olor a la concentración de 0.5%, se corrieron nuevamente pruebas a las condiciones mencionadas en el apartado 4.2.4. con concentraciones de 0.3%, 0.4%, 0.5% y 0.6% de aceite esencial de Clavo de Olor, durante 120 horas, tomando lecturas de área de crecimiento cada 24 horas. Los resultados se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Áreas de Crecimiento en  $\text{cm}^2$  para el Clavo de Olor a Diferentes Concentraciones.

Replicas	Área de Crecimiento $\text{cm}^2$ a Diferentes Tiempos				
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
Control					
1	1.48	6.69	12.95	21.57	32.54
2	1.47	6.65	12.71	20.68	30.11
3	1.45	6.47	12.52	20.49	28.63

Tabla 5.2. Áreas de Crecimiento en cm<sup>2</sup> para el Clavo de Olor a Diferentes Concentraciones (Continuación).

Replicas	Área de Crecimiento cm <sup>2</sup> a Diferentes Tiempos				
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
<b>Clavo de Olor 0.6%</b>					
1	0	0	0	0.01	0.05
2	0	0	0	0.02	0.06
3	0	0	0	0	0.04
<b>Clavo de Olor 0.5%</b>					
1	0.03	0.03	0.08	0.30	0.45
2	0	0	0.06	0.31	0.45
3	0.02	0.02	0.04	0.29	0.46
<b>Clavo de Olor 0.4%</b>					
1	0.33	0.77	0.87	1.07	1.37
2	0.3	0.74	0.80	0.96	1.32
3	0.26	0.71	0.83	0.90	1.31
<b>Clavo de Olor 0.3%</b>					
1	0.14	0.90	3.13	7.01	9.18
2	0.12	0.96	3.35	6.98	9.11
3	0.11	0.88	3.15	6.63	8.98

Se realiza ANOVA (tabla 5.3) ajustado a un modelo lineal general, los factores son; los bloques (las tres replicas), la concentración de aceite esencial (0.3%, 0.4%, 0.5% y 0.6%) y el tiempo en horas (24 hrs., 48 hrs., 72 hrs., 96 hrs. y 120 hrs.), la respuesta son los rangos de las áreas de crecimiento en cm<sup>2</sup>.

Tabla 5.3. ANOVA, Modelo Lineal General para los Rangos de las Áreas de Crecimiento con Aceite Esencial de Clavo de Olor.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor <i>p</i>
Bloques	2	45.5	22.75	1.07	0.348
Concentración	4	28512.8	7128.21	336.05	0.000
Tiempo	4	5085.6	1271.41	59.94	0.000
Error	64	1357.5	21.21		
Total	74	35001.5			

El valor  $p$  para las repeticiones es 0.348 mayor a 0.05, lo que indica que, no son significativas las repeticiones, no así para la concentración y el tiempo. Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 96.12% y un  $R^2$  ajustado de 95.52%, se tiene un buen ajuste lineal simple.

Para poder determinar cuál de las concentraciones en aceite esencial de Clavo de Olor usadas logra inhibir el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*, en comparación con el experimento de control, donde no se adicionó ningún aditivo, se utiliza la prueba de Dunnett. Se realiza el análisis de varianza con las áreas para obtener el cuadrado medio del error (ver tabla 5.4).

Tabla 5.4. ANOVA, Modelo Lineal General Aceite Esencial de Clavo de Olor.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor $p$
Bloques	2	0.88	0.440	3.16	0.056
Concentración	4	2239.87	559.967	4018.92	0.000
Tiempo	4	605.21	151.303	1085.91	0.000
Bloques*Concentración	8	2.49	0.311	2.23	0.051
Bloques*Tiempo	8	1.01	0.126	0.90	0.525
Concentración*Tiempo	16	1165.15	72.822	522.65	0.000
Error	32	4.46	0.139		
Total	74	4019.07			

En valor  $p$ , para la interacción entre las repeticiones contra el tiempo, así como las repeticiones contra la concentración son mayores a 0.05, lo que indica que no es significativa, no así para las demás. En la figura 5.1 se muestra la gráfica de interacción entre las diferentes concentraciones con respecto al tiempo, entre mayor es la concentración menor crecimiento radial de hongo se presenta, entre mayor es el tiempo existe la posibilidad que el aceite esencia pierda sus propiedades y se presenta crecimiento de hongo.

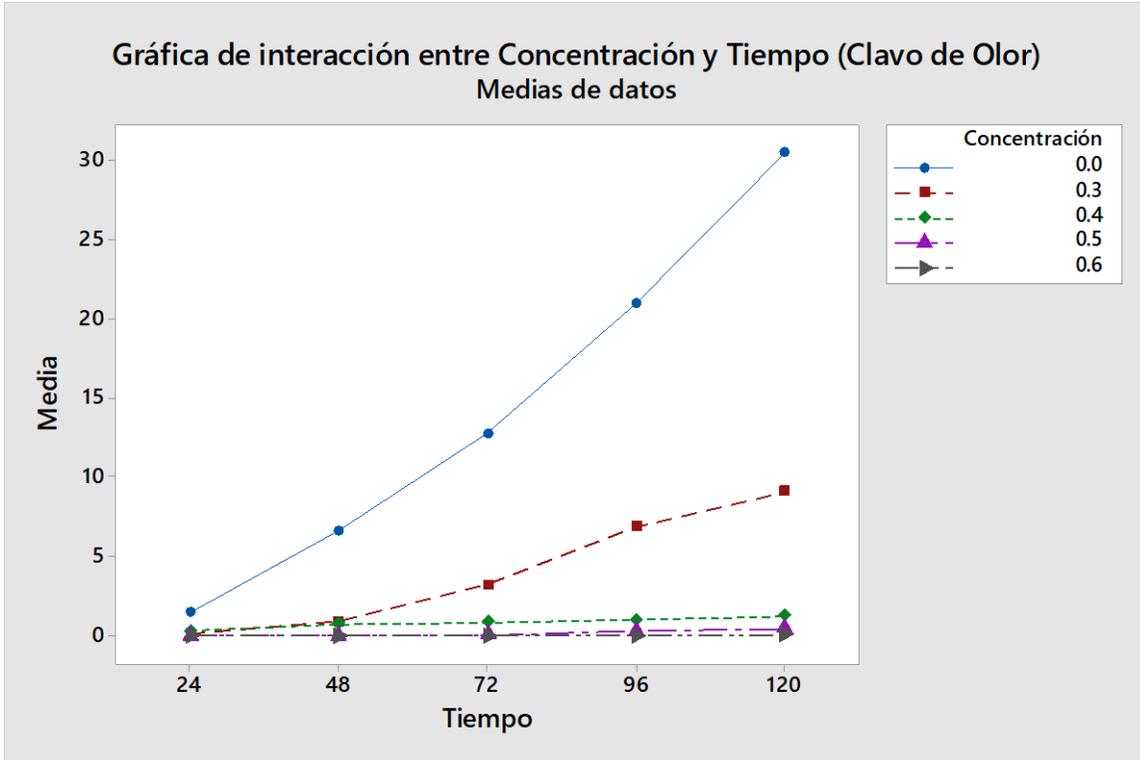


Figura 5.1. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Clavo de Olor Contra el Tiempo.

De la tabla 5.2 se calculan los promedios para cada tratamiento (porcentaje de aceite esencial). Dichos promedios, junto el cuadrado medio del error y los grados de libertad del error de la tabla 5.4 y los rangos de Dunnett, se realiza la prueba de Dunnett. En esta prueba asumiendo que el tratamiento 5 es el control,  $a=1$  ( $a$  es el número de tratamientos),  $a-1=4$ ,  $f=32$  ( $f$  son los grados de libertad del error), con un nivel de significación de 0.05, de Montgomery, (2012) se interpola y se encuentra el valor  $d_{0.05}(4,32) = 2.246$ . Por lo tanto, la diferencia crítica es:

$$d_{0.05}(4,32) \sqrt{\left(\frac{2 CME}{n}\right)} = (2.246) \sqrt{\frac{(2)(0.139)}{5}} = 0.5295$$

En consecuencia, un tratamiento debe considerarse significativamente diferente del control si la diferencia es mayor que 0.5295 o menor de  $-0.5295$ . Las diferencias observadas son:

Clavo 0.6% Vs Control:	$\bar{y}_2 - \bar{y}_1 =$	0.0120-13.2273 =	-13.2273	Diferente
Clavo 0.5% Vs Control:	$\bar{y}_3 - \bar{y}_1 =$	0.1693-13.2273 =	-13.2153	Diferente
Clavo 0.4% Vs Control:	$\bar{y}_4 - \bar{y}_1 =$	0.8360-13.2273 =	-13.0580	Diferente
Clavo 0.3% Vs Control:	$\bar{y}_5 - \bar{y}_1 =$	3.6420-13.2273 =	-9.5853	Diferente

Esto indica que en todas las concentraciones evaluadas existe una diferencia significativa al ser comparadas con el control; por lo tanto, se concluye que al evaluar el aceite esencial de clavo de olor a las concentraciones de 0.3%, 0.4%, 0.5% y 0.6% si existe cierto grado de inhibición del hongo *Aspergillus Flavus*.

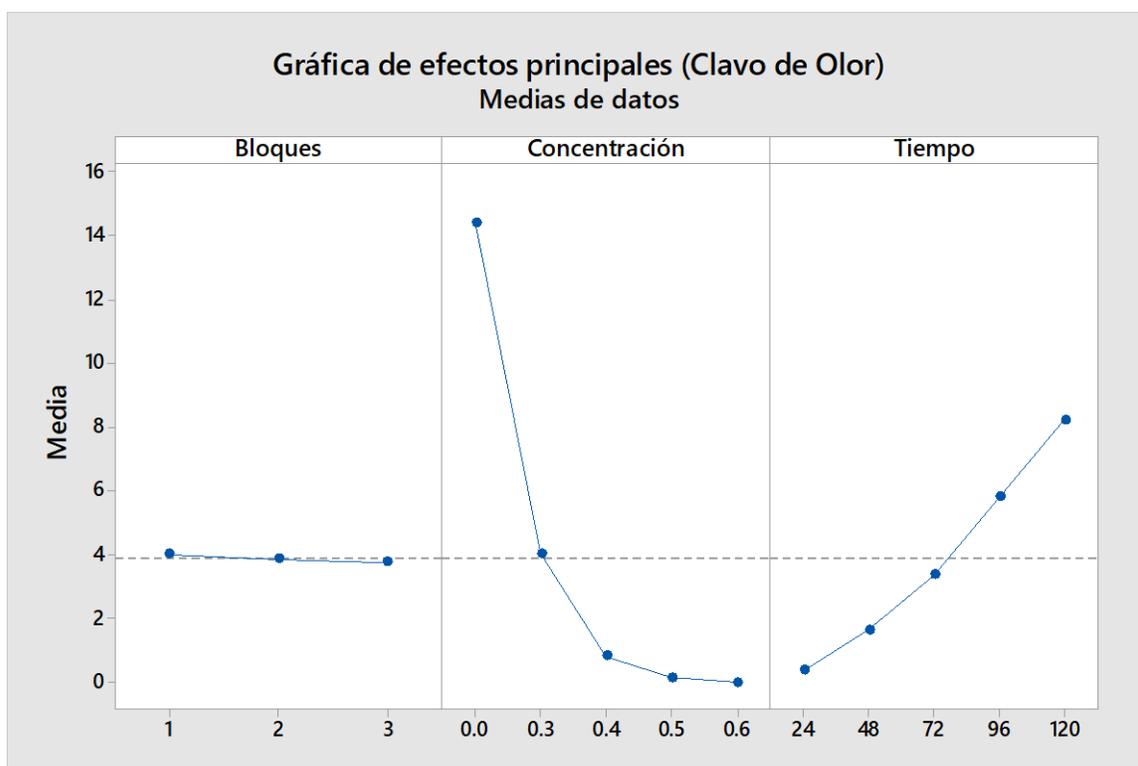


Figura 5.2. Gráfica de Efectos Principales Clavo de Olor.

En la gráfica de efectos principales (Figura 5.2), se observa que entre menor es la concentración de aceite se presenta mayor área de crecimiento y entre mayor es el tiempo transcurrido, mayor posibilidad de crecimiento se presenta.

### 5.3. Primer Experimento para la Hierba Limón.

En el experimento general no hubo crecimiento de hongos para el aceite esencial de hierba limón en concentraciones del 2%, 1% y 0.5%, se tomó la decisión de bajar las concentraciones a 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08% y 0.09% se analizaron nuevamente bajo las mismas condiciones que los demás experimentos. El experimento se realizó por triplicado, los datos se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Áreas de Crecimiento en cm<sup>2</sup> Para la Hierba Limón a Diferentes Concentraciones.

Replicas	Área de Crecimiento cm <sup>2</sup> a Diferentes Tiempos				
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
<b>Control</b>					
1	1.48	6.69	12.95	21.57	32.54
2	1.47	6.65	12.71	20.68	30.11
3	1.45	6.47	12.52	20.49	28.63
<b>Lemon Grass 0.09%</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
<b>Lemon Grass 0.08%</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
<b>Lemon Grass 0.07%</b>					
1	0	0.93	1.92	6.5	11.38
2	0	1.03	1.85	6.23	11.33
3	0	0.97	1.83	6.13	11.07
<b>Lemon Grass 0.06%</b>					
1	0	1.67	3.52	7.28	14.75
2	0	1.67	3.32	7.31	14.79
3	0	1.64	3.27	7.25	14.89
<b>Lemon Grass 0.05%</b>					
1	0.01	1.81	4.35	10.72	19.29
2	0.02	1.88	4.23	10.17	19.28
3	0.02	1.75	4.32	9.93	19.12

Los bloques son cada una de las repeticiones de experimento, la concentración en cinco niveles y el tiempo en horas por 5 días, fueron analizados en el siguiente ANOVA, modelo lineal general, mostrado en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. ANOVA, Modelo Lineal General Para el Aceite Esencial de Hierba Limón.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor $p$
Bloques	2	0.98	0.490	4.27	0.021
Concentración	5	2163.62	432.724	3766.60	0.000
Tiempo	4	1767.52	441.881	3846.30	0.000
Bloques*Concentración	10	2.48	0.248	2.16	0.042
Bloques*Tiempo	8	1.07	0.134	1.17	0.343
Concentración*Tiempo	20	1233.21	61.661	536.72	0.000
Error	40	4.60	0.115		
Total	89	5173.48			

El valor  $p$  calculado para la concentración, bloques, tiempo y algunas interacciones son menores a 0.05, lo que indican que, si son significativas, tienen efectos significantes en el crecimiento del hongo, no así para interacción entre los bloques contra el tiempo con un valor  $p$  de 0.343. Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 99.91% y un  $R^2$  ajustado de 99.80%, se puede decir que se tiene buen ajuste en el modelo. En la figura 5.3 se muestra la gráfica de interacción entre las diferentes concentraciones con respecto al tiempo, entre menor es la concentración de aceite esencial de hierba limón se evidencia mayor crecimiento radial de hongo.

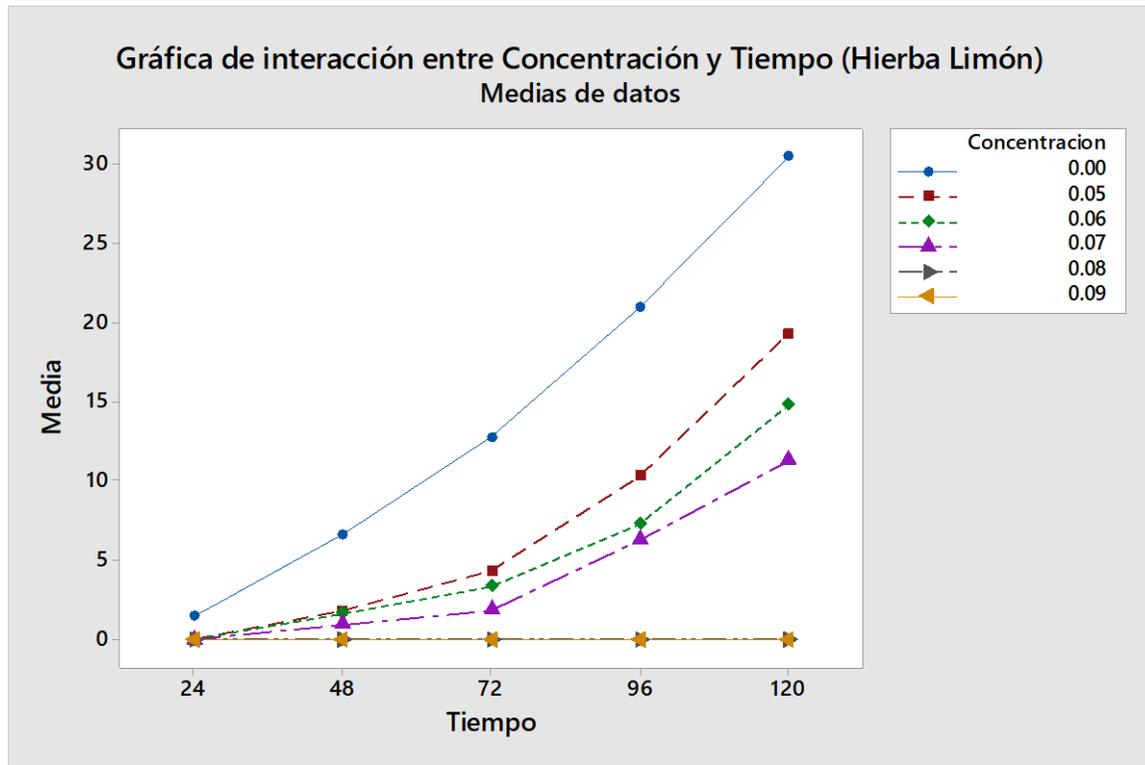


Figura 5.3. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Hierba Limón Contra el Tiempo.

Se realiza la prueba de Dunnett para determinar si las concentraciones usadas con aceite esencial de hierba limón logran inhibir el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*. De la tabla 5.5 se calculan los promedios de las áreas de crecimiento obtenidas para cada concentración de aceite esencial usada. Usando el cuadrado medio del error y los grados de libertad de los del error de la tabla 5.6 y junto con los rangos de Dunnett, se obtiene:

$$d_{0.05}(5,40) \sqrt{\left(\frac{2 CME}{n}\right)} = (2.310) \sqrt{\frac{(2)(0.115)}{6}} = 0.4522$$

En consecuencia, un tratamiento debe considerarse significativamente diferente del control si la diferencia es mayor que 0.4522 o menor de -0.4522. Las diferencias observadas son:

Lemon Grass 0.09% Vs Control:	$\bar{y}_2 - \bar{y}_1 =$	$0.0000 - 13.2273 =$	$-13.2273$	Diferente
Lemon Grass 0.08% Vs Control:	$\bar{y}_3 - \bar{y}_1 =$	$0.0000 - 13.2273 =$	$-13.2273$	Diferente
Lemon Grass 0.07% Vs Control:	$\bar{y}_4 - \bar{y}_1 =$	$4.0780 - 13.2273 =$	$-9.1493$	Diferente
Lemon Grass 0.06% Vs Control:	$\bar{y}_5 - \bar{y}_1 =$	$5.4240 - 13.2273 =$	$-7.8033$	Diferente
Lemon Grass 0.05% Vs Control:	$\bar{y}_6 - \bar{y}_1 =$	$7.1266 - 13.2273 =$	$-6.1007$	Diferente

Esto indica que en todas las concentraciones evaluadas existe una diferencia significativa al ser comparadas con el control; por lo tanto, se concluye que al evaluar las concentraciones de 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06% y 0.05% si existe cierto grado de inhibición del hongo *Aspergillus Flavus*.

Para la estimación por mínimos cuadrados de los coeficientes de un modelo de regresión, sólo es necesaria la suposición de linealidad, la normalidad de los mismos, en base a la cual se realizan los contrastes de hipótesis, está basada también en las suposiciones de normalidad y homoscedasticidad. Por consiguiente, se generaron los residuos de las áreas de crecimiento del aceite esencial de hierba limón, para asegurar que se cumpla lo anterior. En el análisis de los residuos se contrasta que el  $i$ -ésimo residuo  $e_i$ ,  $i=1, \dots, n$  provienen de una población normal con media 0 y varianza  $\sigma^2$  con ayuda de las pruebas de ji-cuadrado, Ryan Joiner, similar a Shapiro-Wilk (Ver figura 5.4).

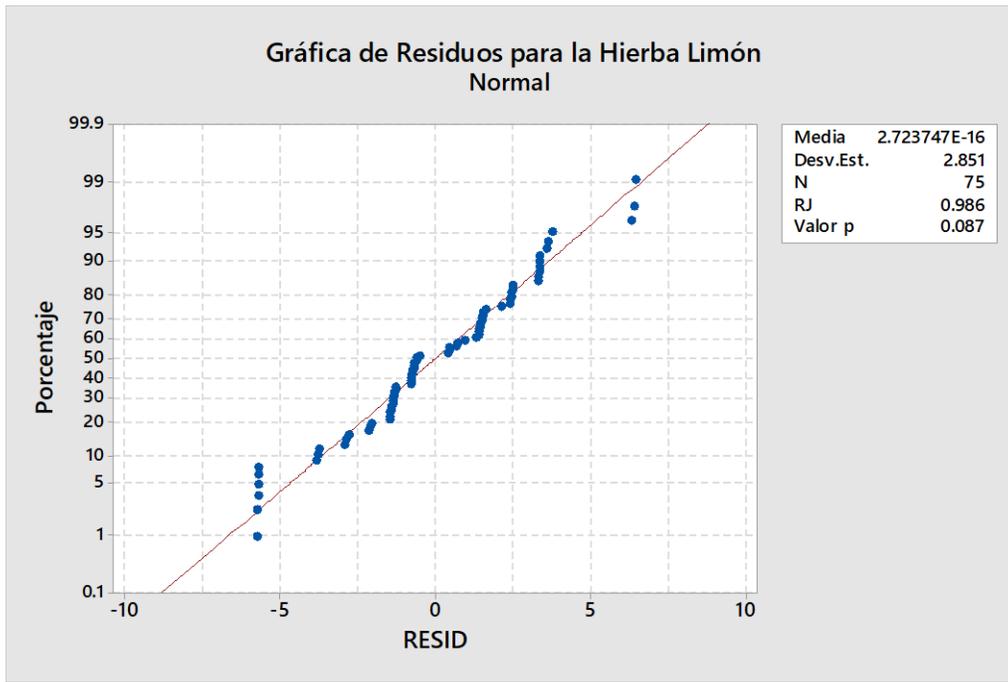


Figura 5.4. Gráfica de Residuos Para la Hierba Limón.

El valor  $p$  calculado de la figura 5.4 es 0.087, mayor a 0.05 lo que indica que los datos son normales. En la figura 5.5 se muestra el gráfico de efectos principales, en las réplicas no hubo variación, la concentración mínima de inhibición para el hongo *Aspegillus Flavus* con aceite esencial de hierba limón es de 0.08%.

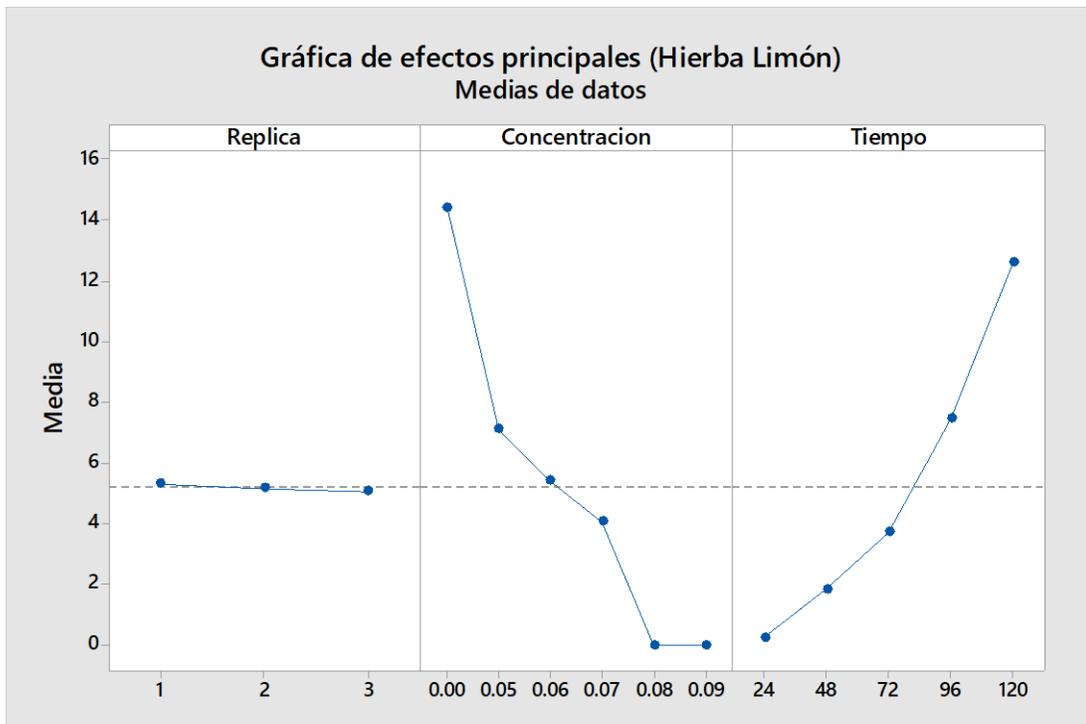


Figura 5.5. Gráfica de Efectos Principales Para la Hierba Limón.

#### 5.4. Primer Experimento Para el Tomillo.

En el experimento general se usaron concentraciones de 0.5%, 1.0% y 2.0% de aceite esencial de tomillo, a esas concentraciones no hubo crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*, se decidió bajar las concentraciones a 0.05%, 0.1% y 0.2%, pero de igual manera no hubo crecimiento de hongo, se optó por probar concentraciones todavía menores a las anteriores (0.02%, 0.03%, 0.04% y 0.05%) de aceite esencial de tomillo, bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo, el experimento nuevamente se realizó por triplicado. Las áreas de crecimiento se muestran en la tabla 5.7.

Tabla 5.7. Áreas de Crecimiento en cm<sup>2</sup> para el Tomillo a Diferentes Concentraciones.

Replicas	Área de Crecimiento cm <sup>2</sup> a Diferentes Tiempos				
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
<b>Control</b>					
1	1.48	6.69	12.95	21.57	32.54
2	1.47	6.65	12.71	20.68	30.11
3	1.45	6.47	12.52	20.49	28.63
<b>Tomillo 0.05%</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
<b>Tomillo 0.04%</b>					
1	0	0	0	0.19	0.36
2	0	0	0	0.2	0.44
3	0	0	0	0.2	0.36
<b>Tomillo 0.03%</b>					
1	0	0.39	0.91	2.1	2.94
2	0	0.44	1.02	2.01	3.12
3	0	0.41	1.02	2.18	3.17
<b>Tomillo 0.02%</b>					
1	0.19	1.97	4.15	8.1	13.13
2	0.23	2.06	4.27	8.32	12.65
3	0.22	1.97	4.22	8.03	13.34

Con los datos anteriores se realiza un ANOVA, modelo lineal general para el aceite esencial de tomillo, los resultados se muestran en la tabla 5.8, donde se analiza la concentración de aceite esencial de tomillo en 4 niveles, el tiempo en 5 niveles y los bloques en tres niveles (réplicas).

Tabla 5.8. Análisis de Varianza, Modelo Lineal General Para el Aceite Esencial de Tomillo.

Fuente	gl	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Bloque	2	0.51	0.256	1.75	0.190
Concentración	4	2234.45	558.612	3816.08	0.000
Tiempo	4	783.14	195.784	1337.47	0.000
Bloque*Concentracion	8	2.81	0.351	2.40	0.037
Bloque*Tiempo	8	0.94	0.117	0.80	0.605
Concentracion*Tiempo	16	1143.90	71.494	488.40	0.000
Error	32	4.68	0.146		
Total	74	4170.43			

El valor  $p$  calculado para los bloques y la interacción entre los bloques y el tiempo son 0.190 y 0.605 respectivamente, lo que indica que para el experimento son irrelevantes, no así para las concentraciones y el tiempo y las demás interacciones. Con un ajuste del modelo bueno dado que el coeficiente de determinación  $R^2$  es de 99.89% y un  $R^2$  ajustado de 99.74%. En la figura 5.6 se muestra la gráfica de interacción entre las diferentes concentraciones con respecto al tiempo, entre menor es la concentración de aceite esencial de tomillo se evidencia mayor crecimiento radial de hongo.

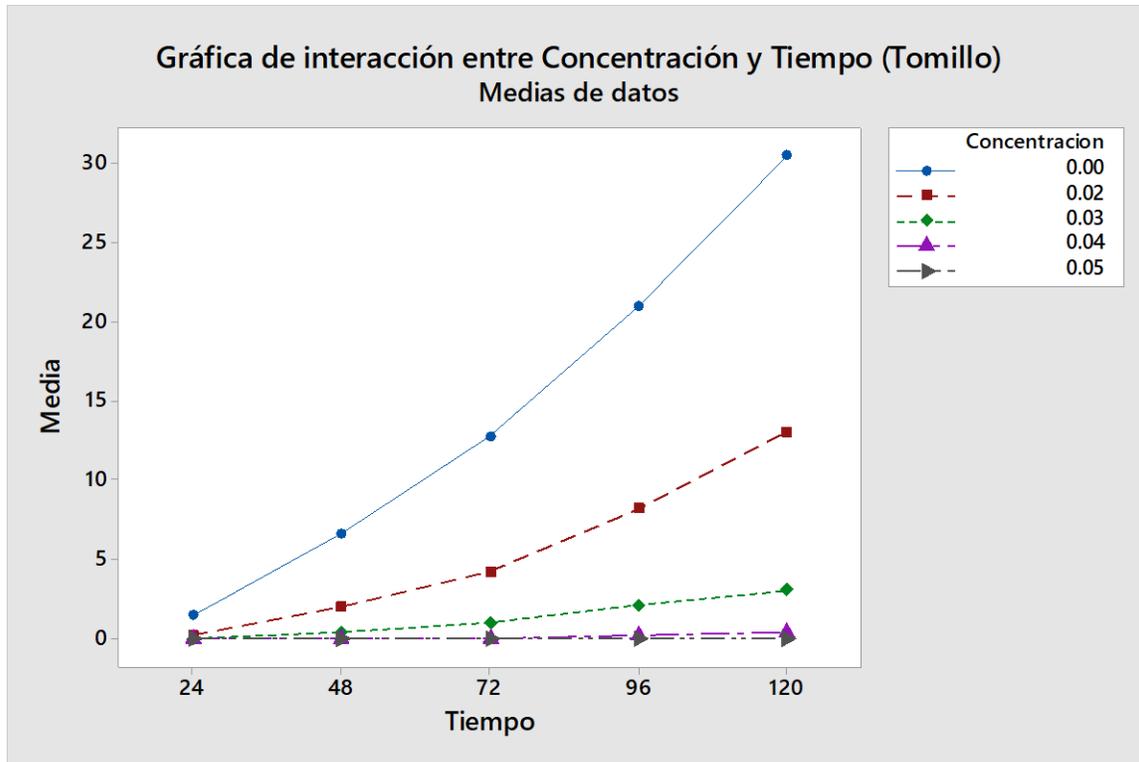


Figura 5.6. Gráfica de Interacción Entre las Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial de Tomillo Contra el Tiempo.

Se realiza la prueba de Dunnett para determinar si las concentraciones usadas con aceite esencial de Tomillo inhiben el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus*. De la tabla 5.7 se calculan los promedios de las áreas de crecimiento obtenidas para cada concentración de aceite esencial usada. Usando el cuadrado medio del error y los grados de libertad de los tratamientos y del error de la tabla 5.8 y junto con los rangos de Dunnett, se obtiene:

$$d_{0.05}(4,32) \sqrt{\left(\frac{2 CME}{n}\right)} = (2.246) \sqrt{\frac{(2)(0.146)}{5}} = 0.5427$$

En consecuencia, un tratamiento debe considerarse significativamente diferente del control si la diferencia es mayor que 0.5427 o menor de -0.5427. Las diferencias observadas son:

Tomillo 0.05% Vs Control:	$\bar{y}_2 - \bar{y}_1 =$	$0.0000-13.2273 =$	$-13.2273$	Diferente
Tomillo 0.04% Vs Control:	$\bar{y}_3 - \bar{y}_1 =$	$0.1166-13.2273 =$	$-13.1107$	Diferente
Tomillo 0.03% Vs Control:	$\bar{y}_4 - \bar{y}_1 =$	$1.3140-13.2273 =$	$-11.9133$	Diferente
Tomillo 0.02% Vs Control:	$\bar{y}_5 - \bar{y}_1 =$	$5.5233-13.2273 =$	$-7.7040$	Diferente

Esto indica que en todas las concentraciones evaluadas existe una diferencia significativa al ser comparadas con el control; por lo tanto, se concluye que al evaluar las concentraciones de 0.05%, 0.04%, 0.03% y 0.02% si existe cierto grado de inhibición del hongo *Aspergillus Flavus*.

Se grafican los residuos para saber si los datos se comportan normalmente, la gráfica se muestra en la figura 5.7, el valor  $p$  es ligeramente superior a 0.05, lo que indica que los datos son normales. En la Figura 5.8. se muestra el gráfico de efectos principales, donde se observa que entre mayor sea el tiempo mayor crecimiento de microorganismos existe, en la replicas se mantuvo constate, la concentración mínima de aceite esencial de tomillo donde no hubo crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* es de 0.05%.

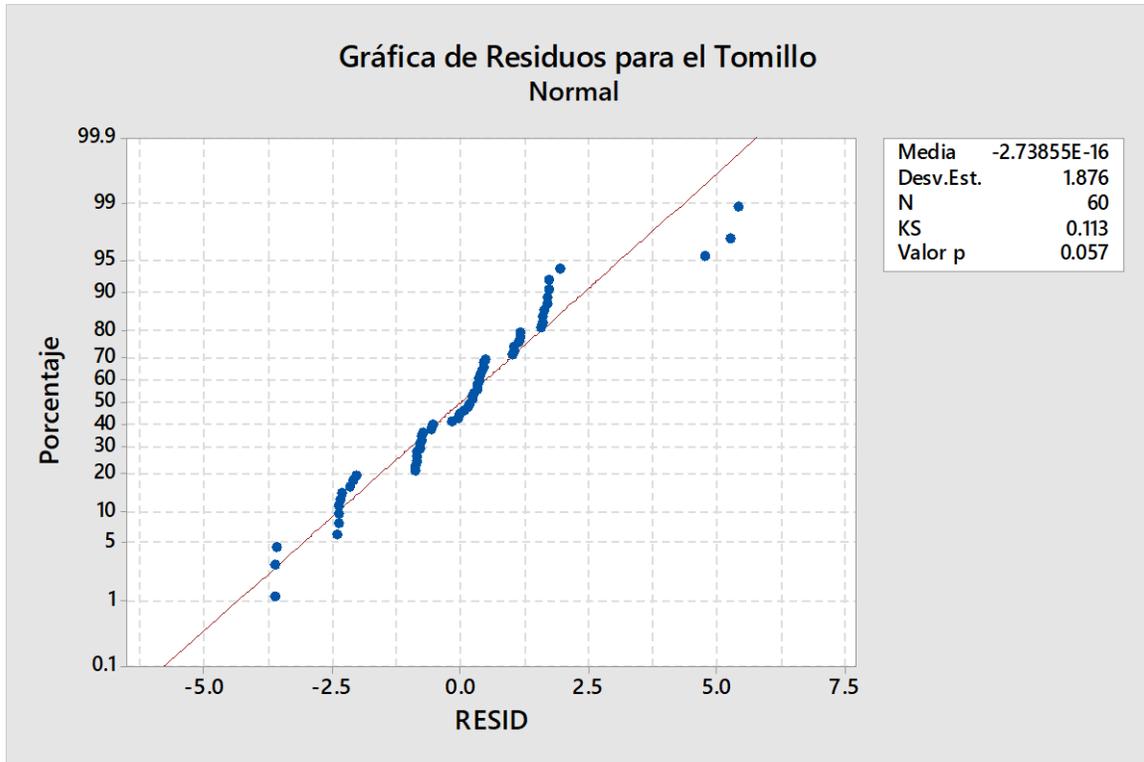


Figura 5.7. Gráfica de Residuos para el Tomillo.

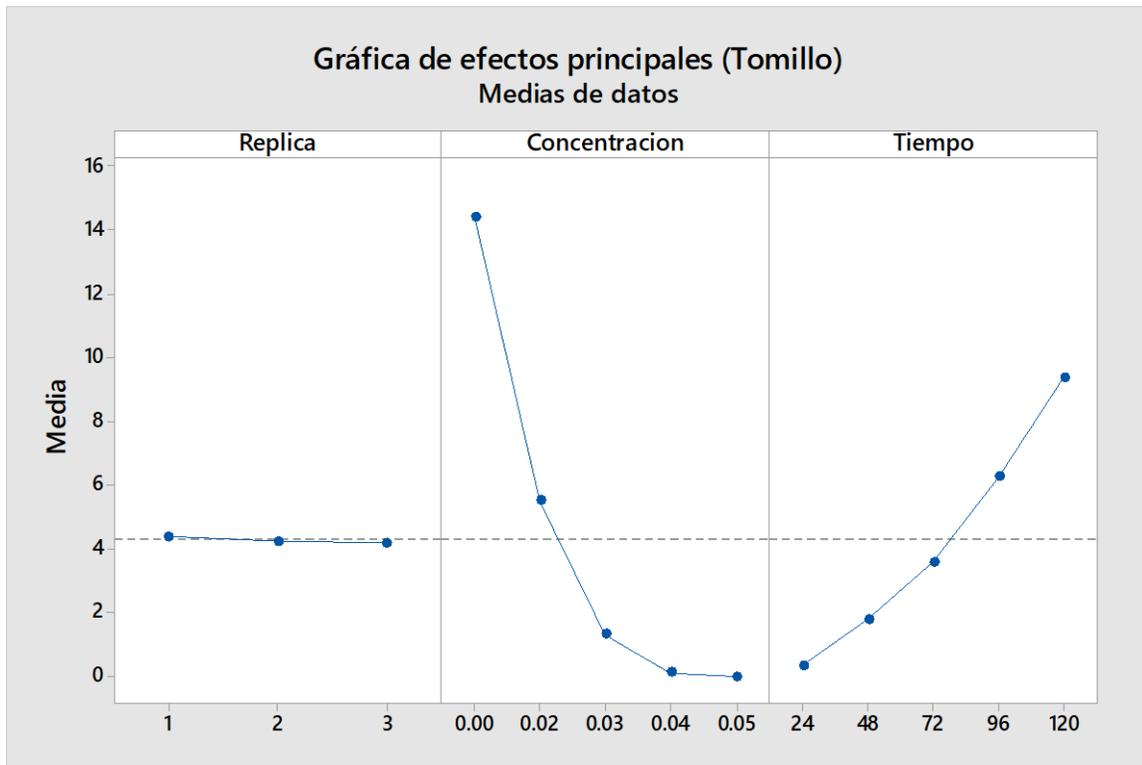


Figura 5.8. Gráfica de Efectos Principales Para el Tomillo.

En resumen, concentraciones mínimas de inhibición para los aceites esenciales se muestran en la tabla 5.9. Son las concentraciones que se usaran en el producto (tortilla de maíz nixtamalizada) como bioconservador, se evaluará si el efecto de la temperatura de cocción afecta las propiedades de inhibición del producto.

Tabla 5.9. Concentraciones Mínimas Inhibitoria de Aceites Esenciales.

Aceite	Concentración mínima de inhibición
Clavo	0.6%
Hierva Limón	0.08%
Tomillo	0.05%

Puede notarse que en dos de los tres casos aun siendo el bloque (réplicas) insignificante, el gran efecto de los tres diferentes aceites esenciales hace parecer relevantes las interacciones entre los bloques y estas concentraciones, sin embargo, no debe perderse de vista que los efectos de las réplicas no representan una contribución significativa a la variación. Si se consideran como referencia de la magnitud de la variación únicamente las sumas de cuadrados, puede observarse que la suma de cuadrados de la concentración es mucho mayor que la suma de cuadrados para el tiempo, por lo que en la estimación del grado de significancia de estas variables con las réplicas (bloques), resulta significativa para la concentración y no así para el tiempo.

### 5.5. Evaluación *In vitro*.

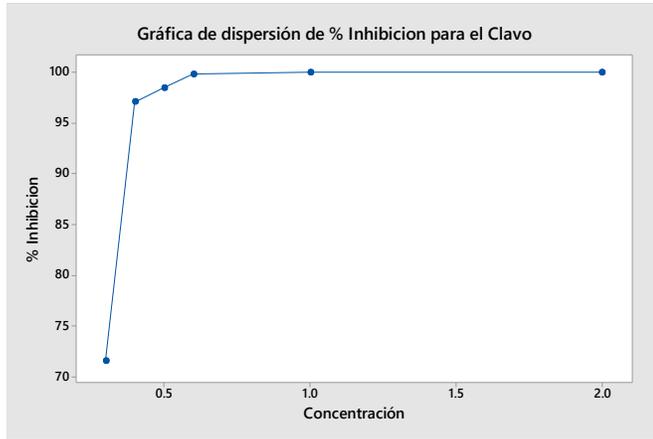
De la sección 4.3, las cajas de Petri previamente inoculadas, se incubaron a una temperatura de 28 °C. el crecimiento del micelio del hongo *Aspergillus flavus* se registró a cinco tiempos diferentes (24 hrs, 48 hrs, 72 hrs, 96 hrs y 120 hrs). Los valores de crecimiento de los micelios de 120 hrs se usaron para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de micelio, usando la ecuación 4.3. los porcentajes de inhibición se muestran en la tabla 5.10.

En la figura 5.9 (a) se muestra el comportamiento del porcentaje de inhibición del aceite esencial de Clavo de olor, se observa que a mayor concentración es más

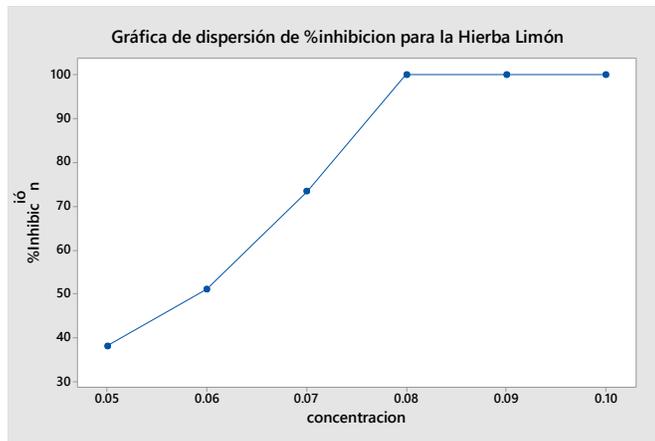
efectiva la inhibición del aceite, en el apartado (b) de la figura, se observa que a partir de la concentración de 0.07% el aceite esencial de hierba limón empieza a perder efectividad, en el apartado (c) se grafican los porcentajes de inhibición para el aceite esencial de tomillo, se muestra que a concentración de 0.04% empieza a registrarse crecimiento radial.

Tabla 5.10. Porcentajes de Inhibición de los Diferentes Aceites Esenciales a Diferentes Concentraciones.

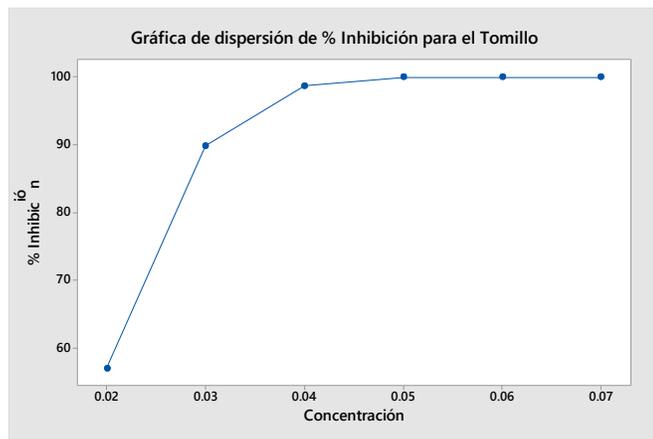
Concentración	Porcentaje de Inhibición		
	A. Clavo	A. Hierba Limón	A. Tomillo
2.0%	100 %	100 %	100 %
1.0%	100 %	100 %	100 %
0.6%	99.8357 %		
0.5%	98.5012 %	100 %	100 %
0.4%	97.0834 %	100 %	100 %
0.3%	71.5585 %	100 %	100 %
0.2%		100 %	100 %
0.1%		100 %	100 %
0.09%		100 %	100 %
0.08%		100 %	100 %
0.07%		73.3535 %	100 %
0.06%		51.1809 %	100 %
0.05%		38.2297 %	100 %
0.04%			98.7161%
0.03%			89.8435%
0.02%			57.0141%



(a)



(b)



(c)

Figura 5.9. Gráficas de Dispersión del Porcentaje de Inhibición de los Diferentes Aceites.

## 5.6. Determinación de los Niveles Óptimos para la Concentración del Tomillo.

Con el procedimiento descrito en la sección 4.4 se analizaron los datos correspondientes a un diseño central compuesto para dos variables donde  $x_1$ : Corresponde a la concentración del aceite esencial del tomillo y  $x_2$ : Tiempo de empaquetado del producto, la cual corresponde a la humedad contenida al momento de empaquetar el producto. El diseño y los tiempos de vida del producto se muestran en la tabla 5.11. Las mediciones se tomaron en intervalos de 2 horas registrando el tiempo de vida hasta observar presencia visible de hongo. Para fines prácticos, los niveles en los puntos axiales se redondearon o aproximaron al valor factible más cercano, en el caso de la concentración a la máxima resolución del instrumento de medición (hasta diezmilésimas), y para el tiempo de empaque del valor negativo se consideró 0 minutos y para el valor axial mayor se consideró como un valor entero de 36 minutos.

Tabla 5.11. Datos de Vida Para Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo de Diferentes Concentraciones y a Diferentes Tiempos de Empaque.

Concentración	Tiempo de Empaque	Vida (Hrs) Replica 1	Vida (Hrs) Replica 2	Vida (Hrs) Replica 3
0.05	0	36	42	36
0.1	0	42	48	54
0.05	30	42	48	42
0.1	30	48	66	60
0.03964466	15	42	42	42
0.11035534	15	42	66	66
0.075	-6.21320344	36	42	66
0.075	36.2132034	66	66	48
0.075	15	42	60	54
0.075	15	42	66	72
0.075	15	42	66	66
0.075	15	42	48	72
0.075	15	60	42	66

Se realiza la prueba de normalidad a los datos obtenidos y se analizan con Ryan-Joiner, así se obtiene la figura 5.10, donde se tiene un valor  $p$  de 0.032 lo que indica que los datos no son lo suficientemente normales.

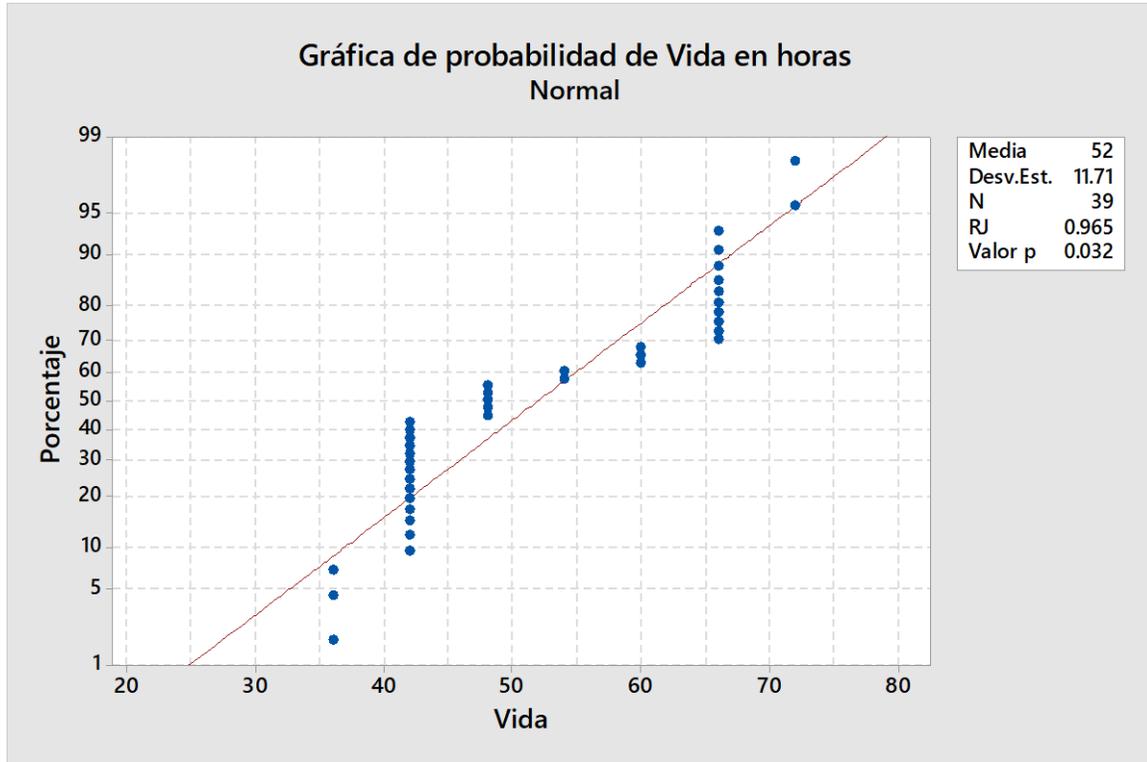


Figura 5.10. Gráfica de Residuos Para la Vida de Tortilla Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo

Como los datos no son los suficientemente normales, se optó por ranquearlos, así se obtiene el siguiente análisis de varianza, ver tabla 5.12.

Tabla 5.12. Análisis de Varianza, Vida de Tortilla Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	1661.90	332.381	3.71	0.009
Lineal	2	1289.78	644.890	7.21	0.003
Concentration	1	807.65	807.655	9.03	0.005
Packaging Time	1	482.12	482.125	5.39	0.027
Cuadrado	2	371.79	185.896	2.08	0.141
Concentration*Concentration	1	323.56	323.560	3.62	0.066
Packaging Time*Packaging Time	1	85.23	85.226	0.95	0.336
Interacción de 2 factores	1	0.33	0.333	0.00	0.952
Concentration*Packaging Time	1	0.33	0.333	0.00	0.952
Error	33	2953.10	89.488		
Falta de ajuste	3	110.43	36.810	0.39	0.762
Error puro	30	2842.67	94.756		
Total	38	4615.00			

En valor  $p$ , para las diferentes concentraciones usadas de aceite esencial de Tomillo, así como para el tiempo de empaquetado son menores a 0.05 lo que indica que son significativas. La concentración de aceite al cuadrado, el tiempo de empaque al cuadrado y la interacción entre los dos factores son mayores a 0.05, lo que indican que no son significativas. Continuando el análisis en las figuras 5.11 y 5.12, se muestran la superficie de respuesta y el contorno de respuesta respectivamente. Dado que la falta de ajuste, en suma de cuadrados, solo representa el 2.39% se considera irrelevante, adicionalmente una probabilidad de cometer el error alfa (valor  $p$ ) superior al nivel de significancia diseñado, en este caso 0.05, indica que el modelo lineal se ajusta adecuadamente a la superficie de respuesta.

Para la prueba de ajuste se consideran las siguientes hipótesis:

$$H_0: \text{No existe falta de ajuste}$$

$$H_1: \text{Existe falta de ajuste}$$

Nuevamente, dado que el valor  $p$  es de 0.762,  $H_0$  no se rechaza.

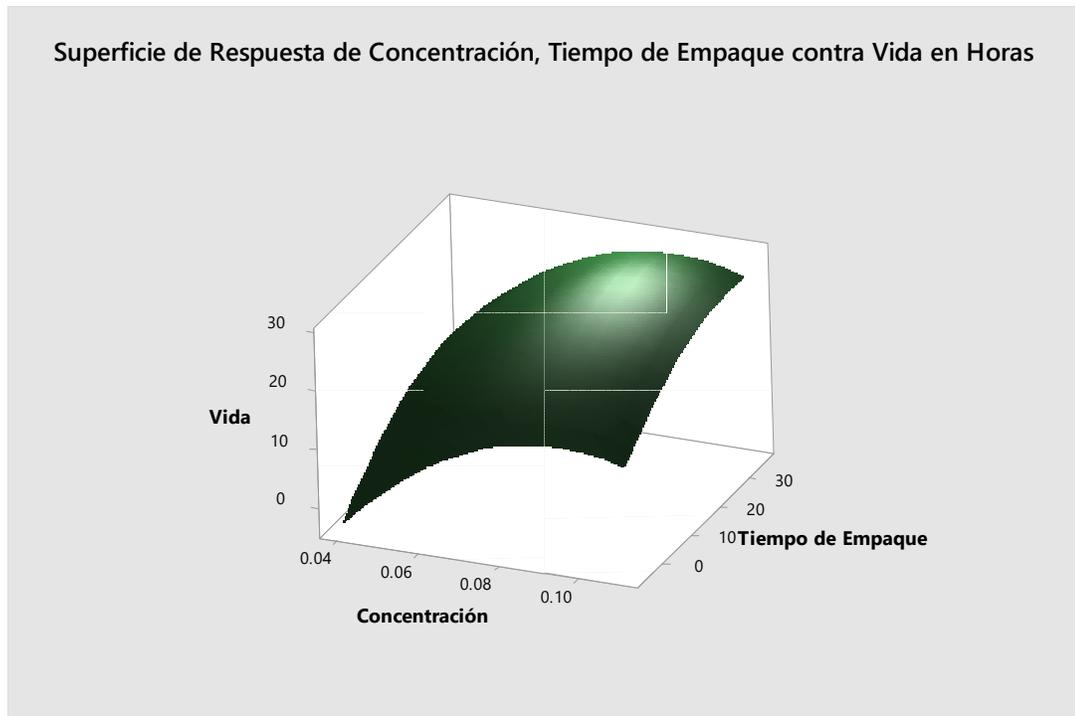


Figura 5.11. Superficie de Respuesta de la Vida en Horas contra Concentración y Tiempo de Empaque

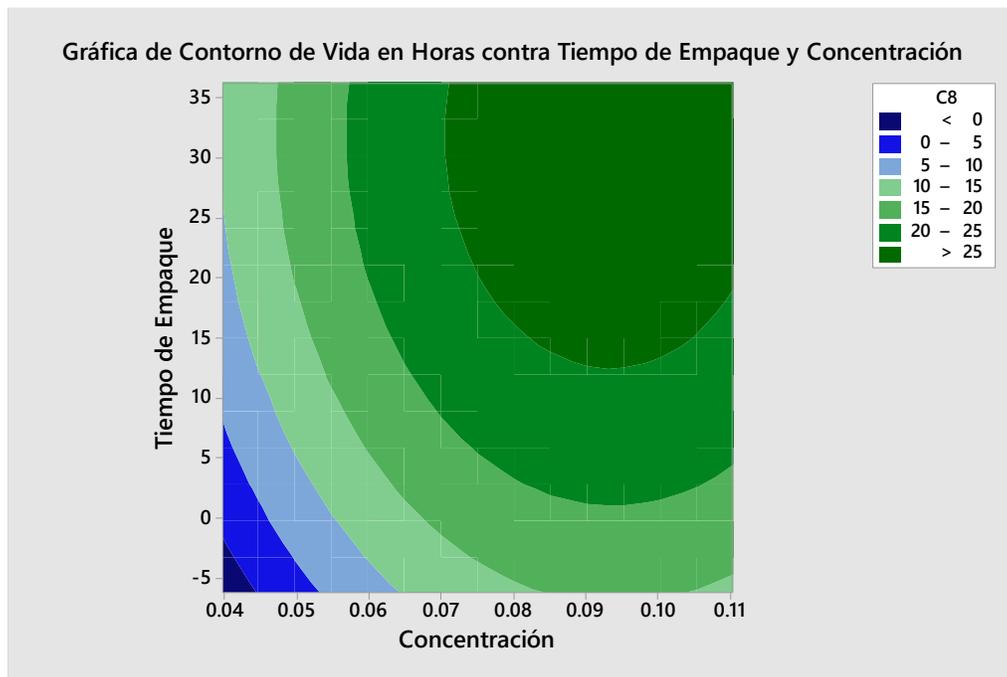


Figura 5.12. Gráfica de Contorno de la Vida en Horas contra Concentración y Tiempo de Empaque.

Utilizando el optimizador de Minitab® se encuentran los niveles de un máximo local para la vida correspondiente a:

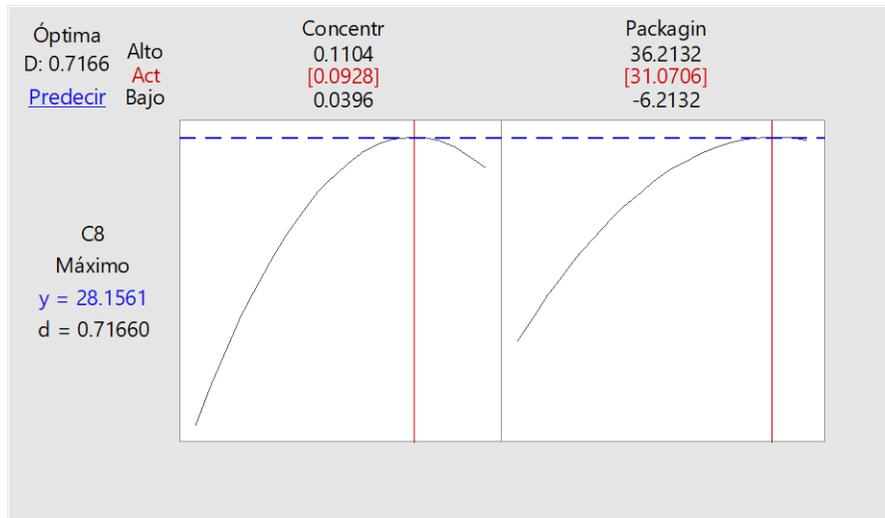


Figura 5.13. Optimizador de Respuesta.

De la figura 5.13 se obtiene los valores óptimos para la concentración de aceite esencial de Tomillo (0.09%) y el tiempo de empaque (31 minutos). Con estos resultados se procede a realizar el experimento correspondiente para la prueba de estrés.

### 5.7. Dependencia de la Temperatura.

Un alimento es un sistema fisicoquímico y biológico activo, por lo que la calidad del mismo es un estado dinámico que se mueve a diferentes niveles (más bajos) respecto al tiempo. Con el procedimiento descrito en la sección 4.6 se obtiene la vida en horas de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.09%, y enfriada por 31 min para después ser empaquetada y estresada a cuatro niveles de temperatura (25 °C, 30 °C, 35°C y 40°C). Los resultados se muestran en la tabla 5.13.

Tabla 5.13. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Estresada a Diferentes Temperaturas.

	25 °C	30°C	35°C	40°C
Vida (Hrs)	84	78	60	36
	72	60	48	48
	84	78	66	40
	78	72	60	44
	78	54	66	44
	90	72	60	44
	84	72	60	36
	90	78	48	40
	84	78	60	44
	84	60	54	36

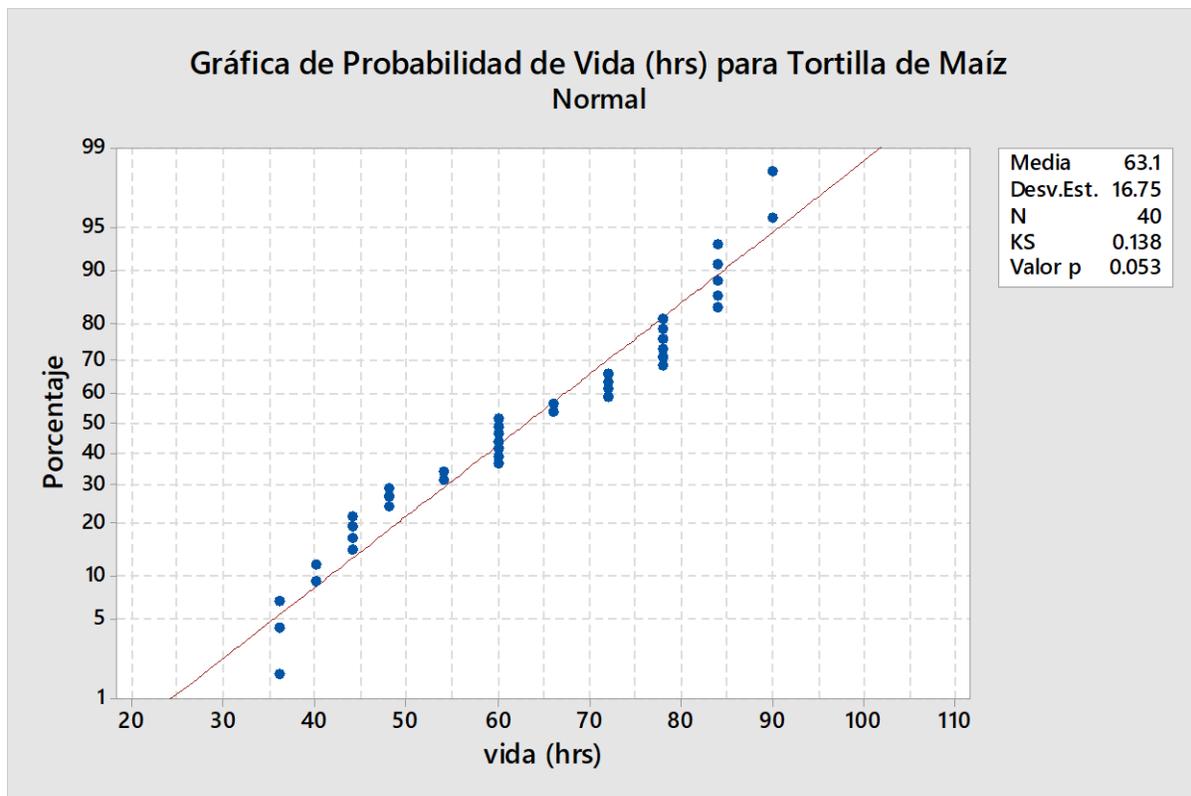


Figura 5.14. Gráfica de Probabilidad Para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09%.

Se realiza la prueba de normalidad a los datos mostrados en la tabla 5.13 y se analizan con la prueba de Kolmogorov-Smirnov así se obtiene la figura 5.14, donde se tiene un valor  $p$  de 0.053 lo que indica que los datos son lo suficientemente normales.

Con los datos anteriores se realiza un ANOVA de un solo factor, donde la respuesta es la vida en horas de la tortilla hasta donde muestra presencia visible de hongo, los factores es la temperatura en 4 niveles (25 °C, 30 °C, 35 °C y 40°C) los resultados de la ANOVA se muestran en la tabla 5.14.

Tabla 5.14. Análisis de Varianza de un Solo Factor para Tortillas de Maíz Estresada a Diferentes Temperaturas.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura (°C)	3	9421	3140.40	74.26	0.000
Error	36	1522	42.29		
Total	39	10944			

El valor  $p$  calculado es menores a 0.05, lo que indican que es significativa la temperatura con respecto al tiempo de vida de la tortilla. Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 86.09% y un  $R^2$  ajustado de 84.93%, se puede decir que se tiene buen ajuste lineal.

Puesto que la constante de velocidad de reacción es función de la temperatura, esta dependencia es descrita por la relación de vida de Arrhenius, mostrada en la ecuación 3.104. Donde  $k$  es la constante de velocidad de reacción,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $1.987 \times 10^{-3} \frac{kcal}{kmol \cdot K}$   $E_a$  es la energía de activación en  $\frac{kcal}{mol}$ ,  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin,  $A$  es el factor pre-exponencial o factor de frecuencia. Al aplicar logaritmos se obtiene la ecuación de una línea recta con pendiente  $E_a/R$ , así se obtienen los siguientes datos (ver tabla 5.15) y se obtienen los valores de  $\beta_0$  y  $\beta_1$ .

Tabla 5.15. Dependencia de la Temperatura

Temperatura °C	Vida (hrs)	K	1/T	Vida <sup>-1</sup>	ln Vida <sup>-1</sup>
25	84	298.15	0.00335402	0.01190476	-4.4308168
25	72	298.15	0.00335402	0.01388889	-4.27666612
25	84	298.15	0.00335402	0.01190476	-4.4308168
25	78	298.15	0.00335402	0.01282051	-4.35670883
25	78	298.15	0.00335402	0.01282051	-4.35670883
25	90	298.15	0.00335402	0.01111111	-4.49980967
25	84	298.15	0.00335402	0.01190476	-4.4308168
25	90	298.15	0.00335402	0.01111111	-4.49980967
25	84	298.15	0.00335402	0.01190476	-4.4308168
25	84	298.15	0.00335402	0.01190476	-4.4308168
30	78	303.15	0.0032987	0.01282051	-4.35670883
30	60	303.15	0.0032987	0.01666667	-4.09434456
30	78	303.15	0.0032987	0.01282051	-4.35670883
30	72	303.15	0.0032987	0.01388889	-4.27666612
30	54	303.15	0.0032987	0.01851852	-3.98898405
30	72	303.15	0.0032987	0.01388889	-4.27666612
30	72	303.15	0.0032987	0.01388889	-4.27666612
30	78	303.15	0.0032987	0.01282051	-4.35670883
30	78	303.15	0.0032987	0.01282051	-4.35670883
30	60	303.15	0.0032987	0.01666667	-4.09434456
35	60	308.15	0.00324517	0.01666667	-4.09434456
35	48	308.15	0.00324517	0.02083333	-3.87120101
35	66	308.15	0.00324517	0.01515152	-4.18965474
35	60	308.15	0.00324517	0.01666667	-4.09434456
35	66	308.15	0.00324517	0.01515152	-4.18965474
35	60	308.15	0.00324517	0.01666667	-4.09434456
35	60	308.15	0.00324517	0.01666667	-4.09434456
35	48	308.15	0.00324517	0.02083333	-3.87120101
35	60	308.15	0.00324517	0.01666667	-4.09434456
35	54	308.15	0.00324517	0.01851852	-3.98898405
40	36	313.15	0.00319336	0.02777778	-3.58351894
40	48	313.15	0.00319336	0.02083333	-3.87120101
40	40	313.15	0.00319336	0.025	-3.68887945
40	44	313.15	0.00319336	0.02272727	-3.78418963
40	44	313.15	0.00319336	0.02272727	-3.78418963
40	44	313.15	0.00319336	0.02272727	-3.78418963
40	36	313.15	0.00319336	0.02777778	-3.58351894

Tabla 5.15. Dependencia de la Temperatura (Continuación)

Temperatura °C	Vida (hrs)	K	1/T	Vida <sup>-1</sup>	ln Vida <sup>-1</sup>
40	40	313.15	0.00319336	0.025	-3.68887945
40	44	313.15	0.00319336	0.02272727	-3.78418963
40	36	313.15	0.00319336	0.02777778	-3.58351894

Para las cuatro temperaturas de estrés se aplicó el modelo de Arrhenius, en la forma como se expresa la ecuación 4.3 aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación y se obtiene el siguiente gráfico del  $\ln(k)$  en función a  $1/T$ .

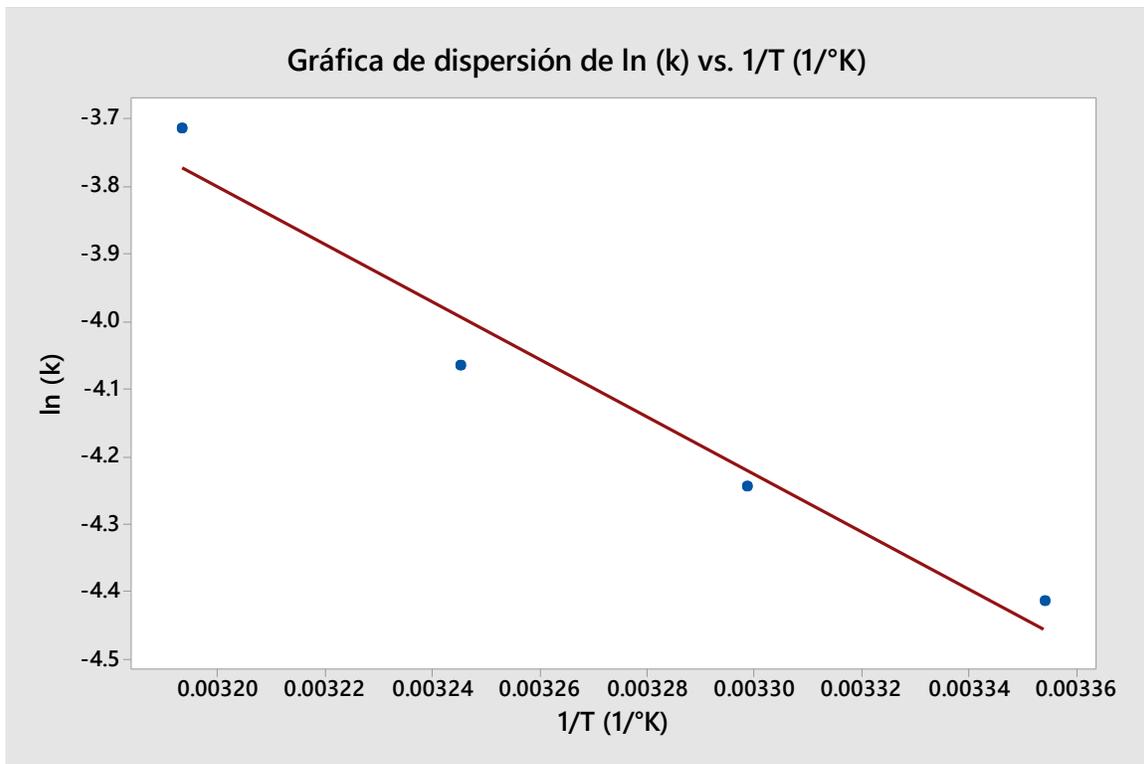


Figura 5.15. Gráfico del  $\ln(k)$  en Función de  $1/T$ .

La ecuación de regresión lineal simple que se obtiene es:

$$\ln(k) = 9.7848 - 4245.3 \cdot 1/T \text{ (} 1/^\circ\text{K)} \quad (5.1)$$

Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 95.90% y un  $R^2$  ajustado de 93.86%, se puede decir que se tiene buen ajuste lineal. La energía de activación, es la energía

mínima necesaria para que se produzca una reacción química. Datos teóricos reportados por Vega et al. (2006), sugieren que para harina de maíz (*Zea mays L.*) se tiene una energía de activación promedio de 8.2480 kcal/mol. Como  $E_a/R = \beta_1$ , y  $\ln(A) = \beta_0$  así:

$$E_a = (4245.3)(1.987 \times 10^{-3}) = 8.4354 \text{ kcal/mol}$$

$$A = e^{-9.7848} = 5.630090 \times 10^{-5}$$

Sustituyendo valores en la ecuación 4.2, se obtiene la vida media a 21 °C.

$$k = 5.630090 \times 10^{-5} e^{\left(\frac{8.4354}{(1.987 \times 10^{-3})(294.15)}\right)} = 104.3356 \text{ horas}$$

104 hrs es el tiempo pronosticado de vida para la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo al 0.09% a una temperatura de 21 °C. También se estima el factor de aceleración de la vida media a entre 21°C y 40 °C.

$$A_f = e^{\left[\left(\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T'}\right)\right]} = e^{\left[\left(\frac{8.4354}{1.987 \times 10^{-3}}\right)\left(\frac{1}{21+273.15} - \frac{1}{40+273.15}\right)\right]} = 2.40048$$

Así, una tortilla de maíz se mantiene sin crecimiento de microorganismo 2.4 veces más tiempo a 21 °C que a 40 °C. en otras palabras, si una tortilla presenta presencia de microorganismo después de una hora a los 40 °C, la vida útil de la tortilla habrá sido 2.4 horas a los 21 °C, de manera similar si una tortilla no muestra presencia de microorganismos en una hora a 40 °C, la tortilla habría sobrevivido 2.4 horas a los 21 °C.

Así mismo se calculó la vida útil de tortilla adicionada con propionato de sodio al 0.2% y se estresó bajo las mismas condiciones que la tortilla adicionada con aceite esencial de tomillo a 0.09% como marca la sección 4.6, la comparación de los tiempos de vida útil de las tortillas adicionadas con aceite esencial de tomillo y propionato de sodio a diferentes temperaturas de almacenamiento se muestran en la tabla 5.16.

Tabla 5.16. Predicción del Tiempo de Vida Útil de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09% y Tortilla de Maíz Adicionada con Propionato de Sodio al 0.2%.

	Aceite Esencial de Tomillo a 0.09%	Propionato de Sodio al 0.2%
Temperatura (°C)	Tiempo de Vida Útil (Horas)	Tiempo de Vida Útil (Horas)
15	140.9142	115.2023
20	109.6029	94.5926
25	85.9706	78.1940
28	74.6015	69.9686
30	67.9762	65.0524
35	54.1594	52.4488

### 5.7.1 Ajuste del modelo de Regresión.

Entre los modelos disponibles están: Arrhenius-Exponencial, Arrhenius-Weibull y Arrhenius-Lognormal. El criterio AIC (Criterio de información AKaike) dado por la ecuación:

$$AIC = -2(\log - Verosimilitud) + 2k \quad (5.2)$$

Proporciona un medio para la comparación entre los modelos de una herramienta para la selección del modelo. Dado un conjunto de datos, varios modelos pueden ser clasificados de acuerdo a su AIC, con el modelo que tiene el mínimo AIC es la mejor. A partir de los valores de la AIC también se puede inferir que, por ejemplo, si dos modelos están más o menos empatados y el resto son mucho peores.

Calculando la log-verosimilitud se obtiene los criterios AIC.

Tabla 5.17. Criterio AIC

Modelo de Regresión	AIC
Arrhenius-Exponencial	417.106
Arrhenius-Weibull	276.302
Arrhenius-Lognormal	276.198

En conclusión, el modelo Arrhenius-Lognormal es el adecuado para analizar los datos de tiempo de vida de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo. Pero para mayor practicidad se usará el modelo Arrhenius-Weibull.

### 5.7.2 Modelo Arrhenius-Weibull.

La vida útil de algunos productos en una prueba acelerada de vida con respecto a la temperatura, se describe con una distribución de Weibull. Los supuestos del modelo Arrhenius-Weibull son los mencionados en el apartado 3.5.1.2.

La confiabilidad de un dispositivo se define como la probabilidad de que ese dispositivo realice su función por al menos un tiempo determinado bajo ciertas condiciones. La fdp ajustada a Arrhenius es:

$$f(t) = \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (5.3)$$

Considerando la ecuación (4.2):

$$k = Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad \therefore \quad k = \alpha$$

$$f(t) = \frac{\beta}{Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)}} \left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)}}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)}}\right)^\beta} \quad (5.4)$$

Con los datos de vida en horas obtenidos se realiza la gráfica general de distribuciones mostrada en la figura 5.16.

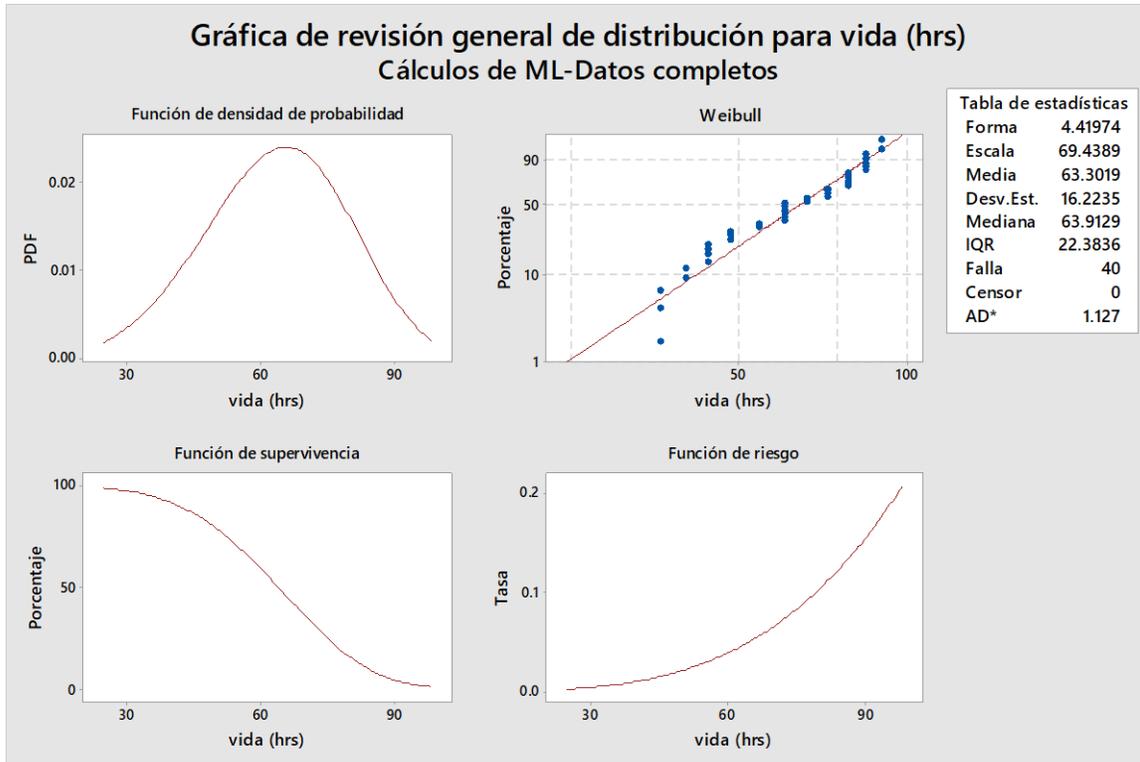


Figura 5.16. Gráfica de Revisión General de Distribución Para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite esencial de Tomillo al 0.09%, Estresada a Diferentes Temperaturas.

$\beta$  es el parámetro de forma con un valor de 4.41974, sustituyendo valores en la ecuación 5.4 se cómo ejemplo la probabilidad de que la tortilla dure 3 días a 21 °C.

$$f(t) = \frac{\beta}{Ae\left(\frac{E_a}{kT}\right)} \left(\frac{t}{Ae\left(\frac{E_a}{kT}\right)}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{Ae\left(\frac{E_a}{kT}\right)}\right)^\beta}$$

$$f(\text{falla a 72hrs}) = \frac{4.41974}{104.3356} \left(\frac{72}{104.3356}\right)^{4.41974-1} e^{-\left(\frac{72}{104.3356}\right)^{4.41974}}$$

$$f(\text{falla a 72hrs}) = 9.81197 \times 10^{-3}$$

Es decir, la probabilidad de que el producto falle a las 72 horas es  $9.81197 \times 10^{-3}$ .  
<sup>3</sup>. También se calcula la función acumulada de falla como se muestra en las ecuaciones

5.5 y 5.6, junto con el parámetro de forma obtenido de la figura 5.16, se calcula la probabilidad acumulada de que el producto viva menos de 72 horas a 21 °C.

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (5.5)$$

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)}}\right)^\beta} \quad (5.6)$$

Sustituyendo valores.

$$F(72 \text{ hrs}) = 1 - e^{-\left(\frac{72}{104.3356}\right)^{4.41974}} = 0.1764$$

La probabilidad de que el producto cumpla satisfactoriamente con la función para la cual fue diseñado, tortilla de maíz con aceite esencial de tomillo a 0.09% como bioconservador durante 72 horas a 21 °C se calcula con la función de confiabilidad de la siguiente manera.

$$R(t) = e^{-\left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)}}\right)^\beta} \quad (5.7)$$

Sustituyendo datos.

$$R(72 \text{ hrs}) = e^{-\left(\frac{72}{104.3356}\right)^{4.41974}} = 0.8235$$

Se sabe que la temperatura mínima y máxima de climatización de ambiente en supermercados es de 21 °C a 26 °C. En la tabla 5.18 se muestran probabilidades de falla calculadas para diferentes temperaturas, así como la función acumulada de falla y la función de confiabilidad

Tabla 5.18.  $f(t)$ ,  $F(t)$  y  $R(t)$ , a Diferentes Temperaturas para la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09 %.

Temperatura °C	Días	$f(t)$	$F(t)$	$R(t)$
21	3	0.00980	0.17636	0.82363
	4	0.01594	0.49938	0.50061
	5	0.01068	0.84356	0.15643
23	3	0.01360	0.25840	0.74159
	4	0.01690	0.65564	0.34435
	5	0.00603	0.94263	0.05736
26	3	0.01972	0.43197	0.56802
	4	0.01235	0.86693	0.13306
	5	0.000892	0.99551	0.00448

Como se observa en la tabla 5.18 entre menor es el tiempo y la temperatura, menor es la probabilidad de falla, entre mayor es el tiempo y a temperaturas elevadas la función de confiabilidad disminuye.

### 5.7.3 Modelo Arrhenius-Lognormal.

Este modelo combina la distribución de probabilidad Lognormal con la relación de Arrhenius. El uso de este modelo implica en los supuestos mencionados en el apartado 3.5.1.3.

De la tabla 5.15 se muestran los datos completos de la prueba de aceleración para la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo estresada a 25 °C, 30 °C, 35°C y 40°C, las tortillas fueron periódicamente inspeccionadas y el tiempo de falla que se muestra en la tabla es cuando hay evidencia visible de aparición de hongo en la tortilla, tiempo en el cual la tortilla fallo. En la figura 5.17 se muestra la dispersión de los datos de la prueba de vida acelerada

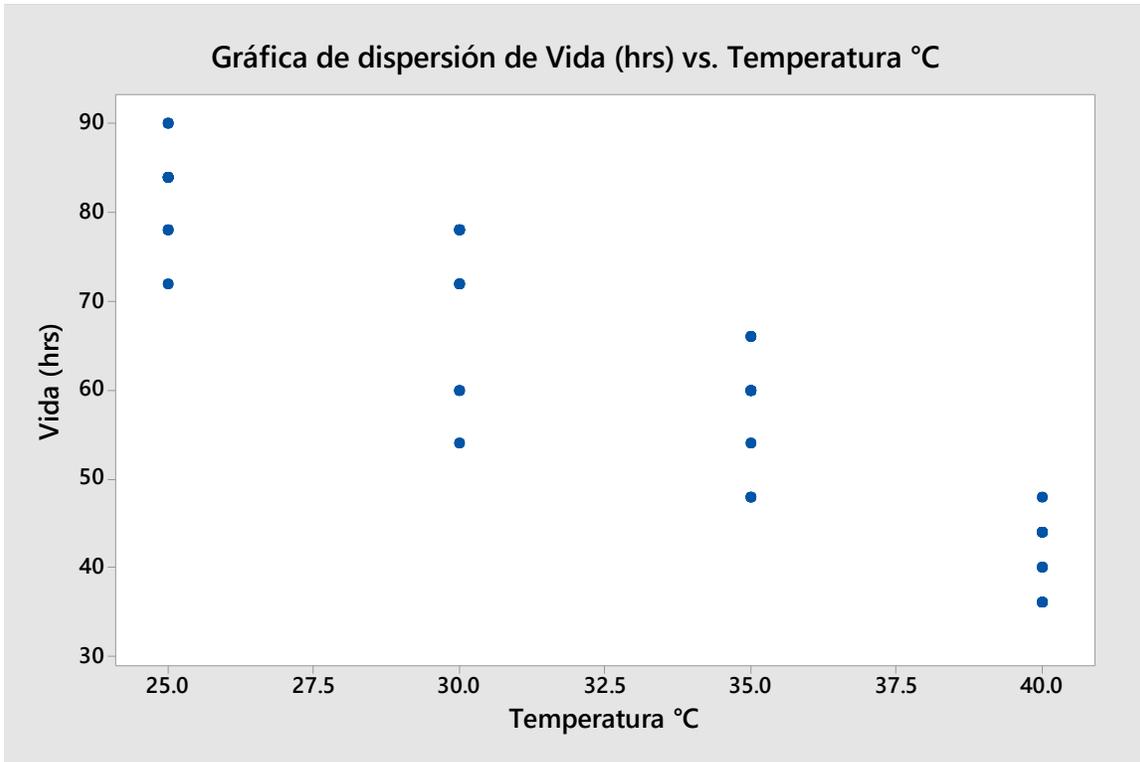


Figura 5.17. Relación entre Temperatura y Tiempos de Falla.

Se observa en la figura 5.17 la relación que existe entre temperatura y los tiempos de falla, a la cual se le aplica la relación Arrhenius, suponiendo una distribución de vida lognormal, el modelo ajustado a datos es el de Arrhenius-Lognormal, cuyos supuestos se mencionaron anteriormente. Los parámetros estimados por máxima verosimilitud (MV) del modelo Lognormal con el parámetro de escala  $\sigma$  constante e independiente de los niveles de esfuerzo son mostrados en la tabla 5.18. Para estimar los parámetros del modelo ajustado, se define un test para verificar la igualdad de los parámetros de escala  $\sigma$  para cada uno de los niveles de esfuerzo (4 niveles de temperatura), se ocupa el estadístico:

$$Q = 2(l_1 + l_2 + \dots + l_j - l) \quad (5.8)$$

Donde  $l_m, m = 1, 2, \dots, j$ , y  $l$  es la log-verosimilitud muestral estimada de  $j$ -ésimo nivel de esfuerzo y del total, respectivamente.

Tabla 5.19. Estimación de los Parámetros con Intervalos de 95% de Confianza.

Parámetros	Estimación por MV	Error Estándar	Intervalo del 95% de Confianza
$\beta_0$	-9.83572	0.983118	(-11.7626, -7.90884)
$\beta_1$	0.367126	0.0258814	(0.316399, 0.417853)
$\sigma$	0.113734	0.0127158	(0.0913528, 0.141598)

La matriz de varianza y covarianza estimada es;

$$V = \begin{bmatrix} 0.966522 & -0.0254402 & 0 \\ -0.025440 & 0.0006698 & 0 \\ 0 & 0 & 0.0001617 \end{bmatrix}$$

La log-verosimilitud total es  $l = -134.099$

Mientras que log-verosimilitudes estimadas en cada nivel de esfuerzo es:

$$l_{25} = -30.918 \quad l_{30} = -36.067 \quad l_{35} = -32.480 \quad l_{40} = -28.135$$

Sustituyendo datos en la ecuación 5.12, el valor del estadístico es:

$$Q = 2(-30.918 - 36.067 - 32.480 - 28.135 + 134.099) = 12.998$$

La distribución de  $Q$  es  $X^2$  con  $r = 8$  parametros en total para los cuatro niveles de esfuerzo y  $k = 4$  parámetros del modelo ajustado ( $k$ ), se tiene  $r - k = 4$  grados de libertad con un nivel de confianza del 99% de Montgomery, 2012 se tiene  $X^2_{(0.99,4)} = 13.28$

$$Q = 12.998 < 13.29 = X^2_{(0.99,4)}$$

Indica que no existe evidencia suficiente para rechazar que el ajuste del modelo es el adecuado con parámetro de escala  $\sigma$  constante,  $\mu(x) = \beta_0 + \beta_1 x$ .

#### 5.7.4. Estimación de los Tiempos de Fallo.

El modelo para prueba acelerada estudiado ajusta adecuadamente los datos, permitiendo dar una buena estimación de la distribución de los tiempos de fallo de una tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo expuesta a 21°C, en la tabla 5.20 muestra los cuantiles estimados de dicha distribución.

Tabla 5.20. Estimación de los Tiempos de Fallo con Intervalos de Confianza del 95%.

Porcentaje	Duración Estimada	Intervalo de Confianza	
		Inferior	Superior
0.1	73.4212	65.5828	82.1964
0.5	77.8448	70.1155	86.4262
1	80.0853	72.4007	88.5855
5	86.5395	78.9198	94.8948
10	90.1902	82.5502	98.5372
20	94.8176	87.0761	103.247
50	104.342	96.0747	113.321
80	114.824	105.449	125.032
90	120.715	110.489	131.887
95	125.807	114.730	137.954
99	135.946	122.902	150.376

Si lo que se desea estimar la vida a una temperatura de 21°C, la duración es 104.324 horas aproximadamente. En situaciones reales lo que se quiere es estimar un cuantil que proporcione garantía a los consumidores, por ejemplo, el 90, 95 o 99, en este caso para el cuantil 95 la duración sería 125.807 horas aproximadamente, lo que quiere decir, que existe una probabilidad de 0.95 de que la tortilla muestre presencia visible de hongo (la falla) después de esas horas de estar en el anaquel. Gráficamente se pueden observar las estimaciones de los tiempos de fallo en la figura 5.18.

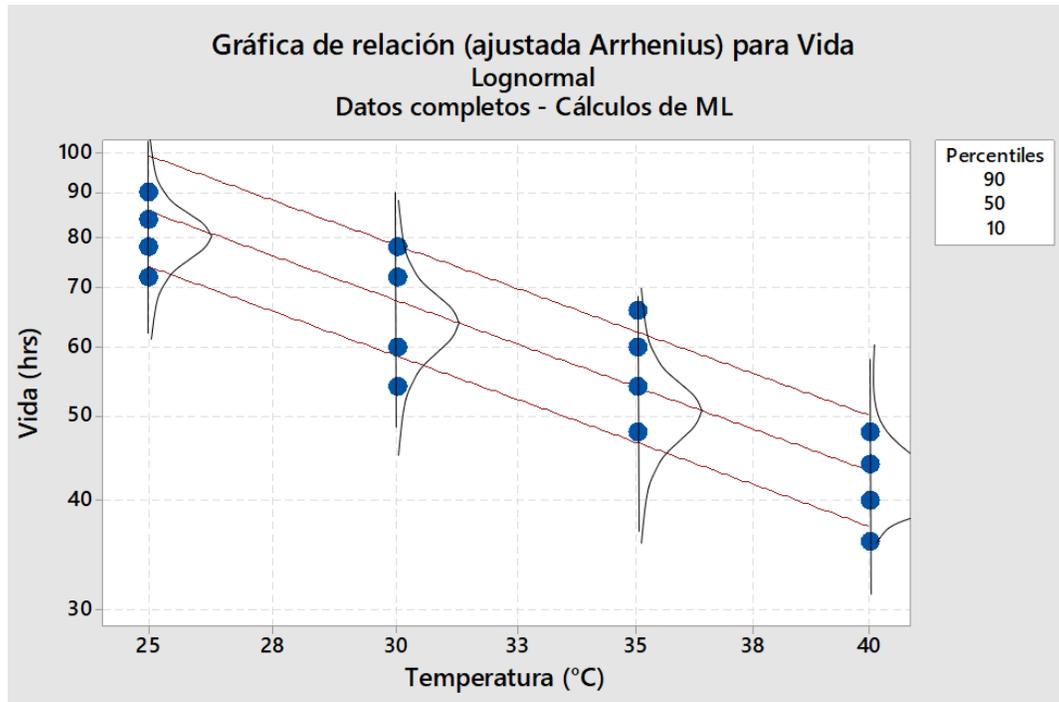


Figura 5.18. Extrapolación de Tiempos de Fallo Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo

### 5.8. Relación Temperatura – Humedad

Los alimentos son expuestos a una gran variedad de condiciones ambientales y de proceso, factores como la temperatura, el tiempo de empaque, la humedad, pueden desencadenar varios mecanismos de reacción que pueden conducir a la degradación del alimento. Tal como se describe en la sección 4.7, se realizó un diseño de bloques totalmente aleatorizado, donde los factores son la temperatura en 4 niveles (25, 30, 35 y 40 °C) y el porcentaje de humedad dentro del empaque en 4 niveles (63, 52, 37.4 y 35 %) con 10 réplicas cada uno, los resultados se muestran en la tabla 5.21.

Tabla 5.21. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Estresada a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque

Temperatura °C	% de Humedad dentro del Empaque				Temperatura °C	% de Humedad dentro del Empaque			
	63	52	37.4	35		63	52	37.4	35
25	60	72	78	102	35	48	54	60	66
	54	54	84	84		54	60	60	72
	54	72	72	96		54	60	66	60
	60	54	84	84		48	60	42	66
	60	66	90	90		54	48	66	60
	60	72	72	78		48	54	60	48
	54	72	90	96		48	64	60	60
	60	66	72	108		54	60	48	72
	54	54	72	84		48	48	48	60
	60	78	66	78		48	54	66	60
30	54	60	78	84	40	36	44	48	56
	48	60	66	90		40	44	44	52
	54	54	72	78		36	36	44	56
	48	54	78	96		36	40	48	52
	60	60	66	78		40	40	44	52
	42	54	90	84		36	40	48	48
	60	60	84	84		40	40	44	56
	54	60	78	78		40	36	40	52
	54	48	78	90		40	44	44	48
	54	54	78	84		40	40	44	48

Se realizó la prueba de normalidad a los datos con Anderson-Darling, Ryan-Joiner y Kolmogorov-Smirnov y los valores  $p$  son menores de 0.01 lo que indica que los datos no son normales, se decidió ranquear los residuos de los datos para poder normalizarlos y se obtuvo la ANOVA que se muestra en la tabla 5.22.

Tabla 5.22. ANOVA, Modelo Lineal General Para Tortillas de Maíz Estresada a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura	3	188904	62968.1	190.52	0.000
Humedad	3	87829	29276.2	88.58	0.000
Temperatura*Humedad	9	13189	1465.5	4.43	0.000
Error	144	47593	330.5		
Total	159	337515			

Los valores de  $p$  para los factores es cero, lo que indica que tanto la temperatura como la humedad (Tiempo de Empaque) y la relación entre ambas, afectan significativamente la vida de anaquel del producto. Con un coeficiente de determinación de 85.9 % y una  $R^2$  de 84.43 %. Se realizó la prueba de igualdad de varianzas, en la cual las hipótesis a probar son:

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \sigma_4$$

$$H_1: \sigma_1 \neq \sigma_2 \neq \sigma_3 \neq \sigma_4$$

Dado que el valor  $p$  es, la probabilidad de cometer el error  $\alpha$ , rechazar  $H_0$  siendo verdadera, y el valor  $p$  obtenido de la prueba de igualdad de varianzas es de 0.000, se puede rechazar  $H_0$  con toda confianza, es decir, se cuenta con suficiente evidencia para indicar que las varianzas en con respecto a todos los niveles de la temperatura y la humedad son diferentes. En la figura 5.19 y 5.20 se muestra la prueba de igualdad de varianzas de la vida con respecto a la temperatura y la humedad.

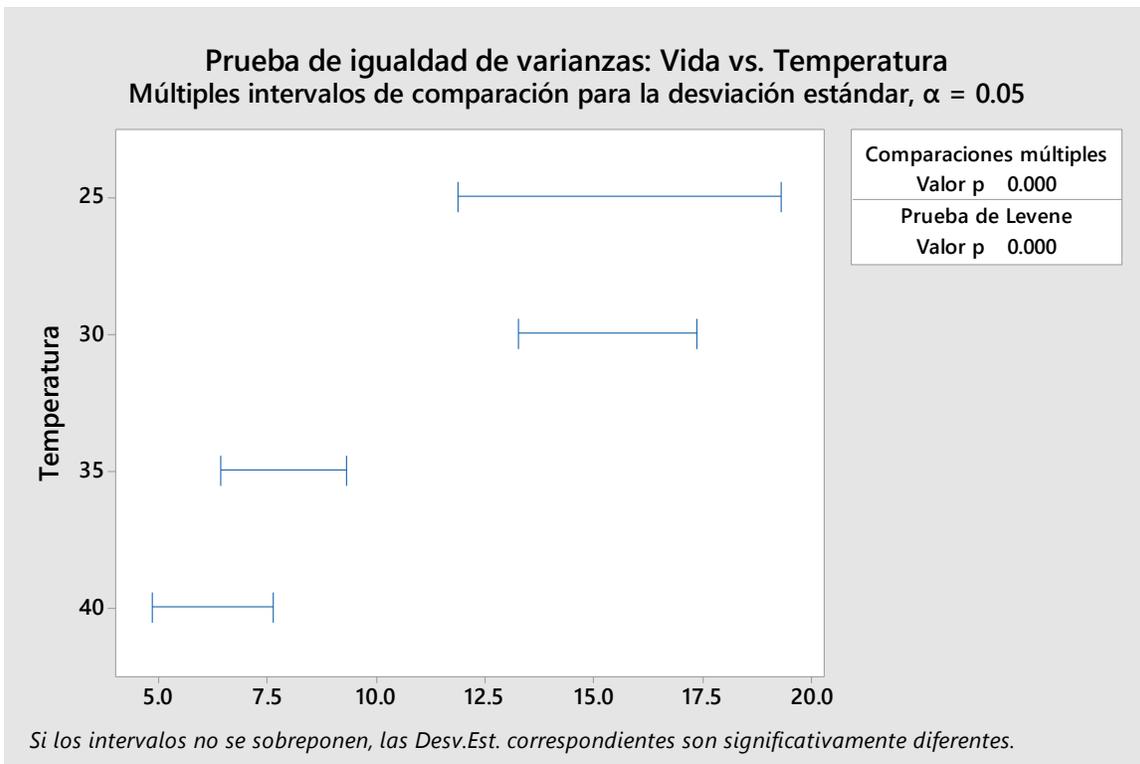


Figura 5.19. Prueba de Igualdad de Varianzas, Vida contra Temperatura.

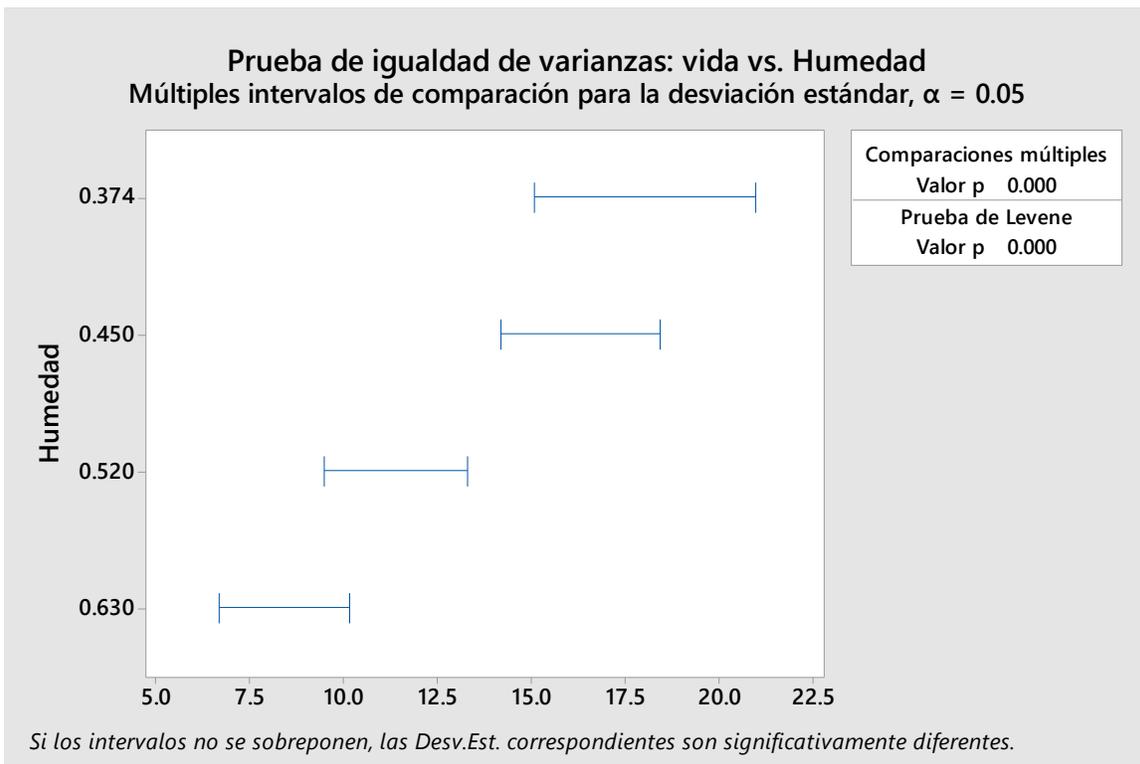


Figura 5.20. Prueba de Igualdad de Varianzas, Vida contra Humedad.

En muchas aplicaciones, la humedad es usada junto con la temperatura en pruebas de vida acelerada, con respecto a la inversa de la temperatura absoluta, la inversa de la humedad, así como el logaritmo natural de la vida obtenida de la tabla 5.13, se obtiene siguiente ecuación de regresión lineal múltiple:

$$\ln f(T, H) = \beta_0 + \beta_1 \left(\frac{1}{T}\right) + \beta_2 \left(\frac{1}{H}\right) \quad (5.9)$$

$$\ln f(T, H) = -6.7075 + 3073.1066 \left(\frac{1}{T}\right) + 0.3404 \left(\frac{1}{H}\right)$$

Cómo;

$$L(T, H) = Ae^{\left(\frac{\theta + b}{T + H}\right)} \quad (5.10)$$

Siendo  $A$  un factor de frecuencia,  $\theta$  y  $b$  son constantes donde;  $A = e^{\beta_0}$ ,  $\theta = \beta_1$  y  $b = \beta_2$ . Sustituyendo valores en la ecuación 5.9 se obtiene lo siguiente:

$$L(T, H) = 1.2216 \times 10^{-3} e^{\left(\frac{3073.1066}{T} + \frac{0.3404}{H}\right)}$$

A una temperatura de 21 °C y a un tiempo de empaque después de 30 min de enfriamiento (HR 37.4%) de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo al 0.09%, se obtiene el pronóstico de vida en horas.

$$L(T, H) = 1.2216 \times 10^{-3} e^{\left(\frac{3073.1066}{294.15} + \frac{0.3404}{0.374}\right)}$$

$$L(T, H) = 104.5828 \text{ Hrs}$$

Si la temperatura de uso es 21 °C y la temperatura de estrés es 40°C, así como la humedad relativa de uso es 37.4 % y la humedad relativa de estrés es 63%, se calcula el factor de aceleración.

$$F_A = e^{\theta \left(\frac{1}{T_u} - \frac{1}{T_E}\right) + b \left(\frac{1}{H_u} - \frac{1}{H_E}\right)} \quad (5.11)$$

Sustituyendo valores en la ecuación 5.10 se obtiene:

$$F_A = e^{3073.1066 \left(\frac{1}{294.15} - \frac{1}{313.15}\right) + 0.3404 \left(\frac{1}{0.374} - \frac{1}{0.63}\right)}$$

$$F_A = 2.7284$$

Es decir, una tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo al 0.09% empaquetada a los 30 min después de enfriar y expuesta a 21 °C dura 2.72 veces más que una tortilla de maíz de las mismas características empaquetada inmediatamente después de su fabricación (0 min) y expuesta a 40 °C.

Así mismo se calculó la vida útil de tortilla adicionada con propionato de sodio al 0.2% y se estresó bajo las mismas condiciones que la tortilla adicionada con aceite esencial de tomillo a 0.09% como marca la sección 4.7, la comparación de los tiempos de vida útil de las tortillas adicionadas con aceite esencial de tomillo y propionato de sodio a diferentes temperaturas y diferentes tiempos de empaque (Humedad dentro del empaque) se muestran en la tabla 5.23.

Tabla 5.23. Predicción del Tiempo de Vida Útil de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09% y Tortilla de Maíz Adicionada con Propionato de Sodio al 0.2% a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempos de Empaque.

Temperatura	Tiempo de empaque	Vida Pronosticada en Horas	
		Aceite Esencial de Tomillo a 0.09%	Propionato de Sodio al 0.2%
21 °C	0 min	72.25600931	67.9762641
	15 min	81.00559377	75.8055431
	30 min	104.5927213	96.727733
	45 min	111.3287548	102.660281
23 °C	0 min	67.33368423	62.549991
	15 min	75.48721724	69.75429
	30 min	97.46750939	89.0063453
	45 min	103.7446614	94.4653218
26 °C	0 min	60.67897047	55.3271128
	15 min	68.02667459	61.6995049
	30 min	87.83461341	78.7284543
	45 min	93.49138277	83.5570627

### 5.8.1 Modelo T-H-Weibull.

La vida útil de algunos productos en una prueba acelerada de vida con respecto a la temperatura y humedad, se describe con una distribución de Weibull. Los supuestos del modelo T-H-Weibull son los mencionados por Nelson (2004).

1. A una temperatura absoluta  $T$  y a una humedad relativa  $H$  la vida del producto tiene distribución Weibull; el logaritmo natural de la vida tiene una distribución de valores extremos.
2. El parámetro de forma  $\beta$  es una constante independiente de la temperatura y la humedad; la distribución del valor extremo del logaritmo natural de la vida tiene un parámetro de escala constante  $\delta = 1/\beta$ .
3. El logaritmo natural de la vida en Weibull es una función lineal de la inversa de la temperatura y de la inversa de la humedad relativa.

$$\ln f(T, H) = \ln A + \frac{\theta}{T} + \frac{b}{H} \quad (5.12)$$

La función de densidad de probabilidad ajustada a la temperatura y la humedad, considerando la ecuación 5.3:

$$f(t) = \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta}$$

$$k = Ae^{\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)} \quad \therefore \quad k = \alpha \quad (5.13)$$

$$f(t) = \frac{\beta}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)}} \left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)}}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)}}\right)^\beta} \quad (5.14)$$

Con los datos de vida en horas obtenidos se realiza la gráfica general de distribuciones mostrada en la figura 5.21.

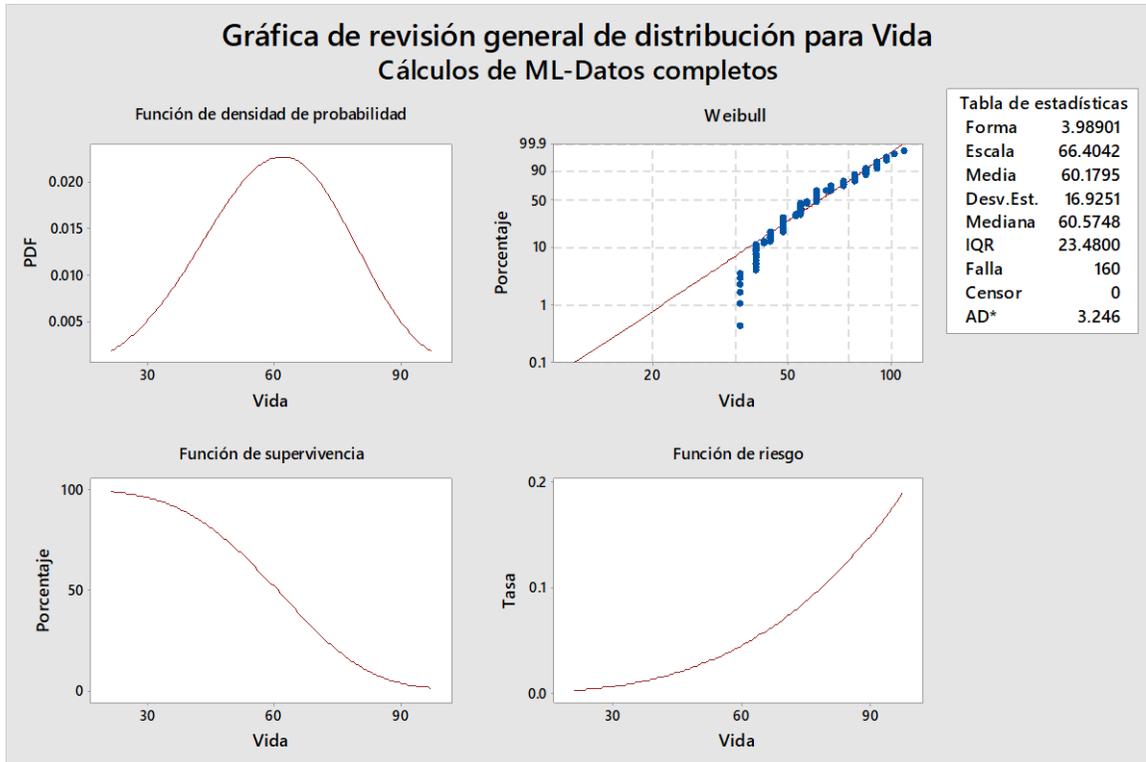


Figura 5.21. Gráfica de Revisión General de Distribución para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09%, Estresada a Diferentes Temperaturas y Diferentes Tiempo de Empaque.

$\beta$  es el parámetro de forma con un valor de 3.98901, sustituyendo valores en la ecuación 5.18 se calcula cómo ejemplo, la probabilidad de que la tortilla dure 3 días a 21 °C, con un tiempo de empaque de 30 min.

$$f(t) = \frac{\beta}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T+H}\right)}} \left( \frac{t}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T+H}\right)}} \right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{Ae^{\left(\frac{\theta}{T+H}\right)}}\right)^\beta}$$

$$f(\text{falla a 72hrs}) = \frac{3.98901}{104.5828} \left( \frac{72}{104.5828} \right)^{3.98901-1} e^{-\left(\frac{72}{104.5828}\right)^{3.98901}}$$

$$f(\text{falla a 72hrs}) = 9.973369 \times 10^{-3}$$

Es decir, la probabilidad de que el producto falle a las 72 horas es  $9.973369 \times 10^{-3}$ . También se calcula la función acumulada de falla como se muestra en las ecuaciones 5.5 y 5.19, junto con el parámetro de forma obtenido de la figura 5.20, se calcula la probabilidad acumulada de que el producto viva menos de 72 horas a 21 °C.

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (5.5)$$

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{Ae\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)}\right)^\beta} \quad (5.19)$$

Sustituyendo valores.

$$F(72 \text{ hrs}) = 1 - e^{-\left(\frac{72}{104.5828}\right)^{3.98901}} = 0.201934$$

La probabilidad de que el producto cumpla satisfactoriamente con la función para la cual fue diseñado, tortilla de maíz con aceite esencial de tomillo a 0.09% como bioconservador durante 72 horas a 21 °C a un tiempo de empaque de 30 min, se calcula con la función de confiabilidad de la siguiente manera.

$$R(t) = e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (5.20)$$

$$R(t) = e^{-\left(\frac{t}{Ae\left(\frac{\theta}{T} + \frac{b}{H}\right)}\right)^\beta} \quad (5.21)$$

Sustituyendo datos.

$$R(72 \text{ hrs}) = e^{-\left(\frac{72}{104.5828}\right)^{3.98901}} = 0.7980$$

En la tabla 5.24 se muestran probabilidades de falla calculadas para diferentes temperaturas y a diferentes tiempos de empaque, así como la función acumulada de falla y la función de confiabilidad

Tabla 5.24.  $f(t)$ ,  $F(t)$  y  $R(t)$ , a Diferentes Temperaturas y diferentes tiempos de empaque para la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo al 0.09 %.

Días	Temperatura	Tiempo de Empaque	$f(t)$	$F(t)$	$R(t)$
3	21 °C	0 min	0.020379512	0.626913	0.373087
		15 min	0.018533639	0.464702	0.535298
		30 min	0.009970439	0.201867	0.798133
	23 °C	0 min	0.019599469	0.729211	0.270789
		15 min	0.020043463	0.563104	0.436896
		30 min	0.012277628	0.25827	0.74173
	26 °C	0 min	0.015156293	0.861739	0.138261
		15 min	0.019824992	0.714676	0.285324
		30 min	0.015945239	0.363963	0.636037
4	21 °C	0 min	0.005778432	0.9552304	0.0447696
		15 min	0.011422033	0.860384	0.139616
		30 min	0.014506727	0.508541	0.491459
	23 °C	0 min	0.002789568	0.983689	0.016311
		15 min	0.007980673	0.926379	0.073621
		30 min	0.015258786	0.609871	0.390129
	26 °C	0 min	0.000508271	0.99803773	0.001962272
		15 min	0.003157492	0.980768	0.019232
		30 min	0.014242665	0.759564	0.240436
5	21 °C	0 min	0.000130334	0.99948172	0.00051828
		15 min	0.001318336	0.9917291	0.0082709
		30 min	0.010195001	0.822728	0.177272
	23 °C	0 min	$1.477 \times 10^{-5}$	0.99995567	0.000044326
		15 min	0.0003676	0.99825951	0.001740494
		30 min	0.007698293	0.8989776	0.1010224
	26 °C	0 min	$1.2874 \times 10^{-7}$	0.99999974	$2.551 \times 10^{-7}$
		15 min	$2.11774 \times 10^{-5}$	0.9999338	0.000066205
		30 min	0.003584348	0.96894344	0.03105656

Como se observa en la tabla 5.21 entre menor es el tiempo y la temperatura y mayor el tiempo de empaque, menor es la probabilidad de falla, entre mayor es el tiempo y a temperaturas elevadas y el tiempo de empaque es menor la función de confiabilidad disminuye.

### 5.9. Modelo de Riesgo Proporcional de Cox.

El ácido fumárico se utiliza en la industria alimenticia como agente reductor, mejorador de textura, agente de leudado, regulador de pH y agente conservante. Con el procedimiento descrito en la sección 4.8 se obtiene la vida en horas de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.09%, con un pH modificado en el agua de 3, 4, 5 y 6 y un porcentaje de humedad dentro del empaque de 63, 52, 37 y 35% y estresadas a temperaturas de 25, 30, 35 y 40) con 10 repeticiones cada experimento, se agregó una columna con 0 y 1 donde 0 representa que la tortilla ya muestra presencia visible de hongo y 1 representa que la tortilla aún sigue sin mostrar presencia visible de hongo. Los resultados del experimento se encuentran en la tabla A, del anexo. Se realiza la prueba de normalidad a los datos mostrados en la tabla A y se analizan con la prueba de Ryan-Joiner, similar a Shapiro-Wilk, así se obtiene la figura 5.22, donde se tiene un valor  $p$  superior a 0.1 lo que indica que los datos son lo suficientemente normales.

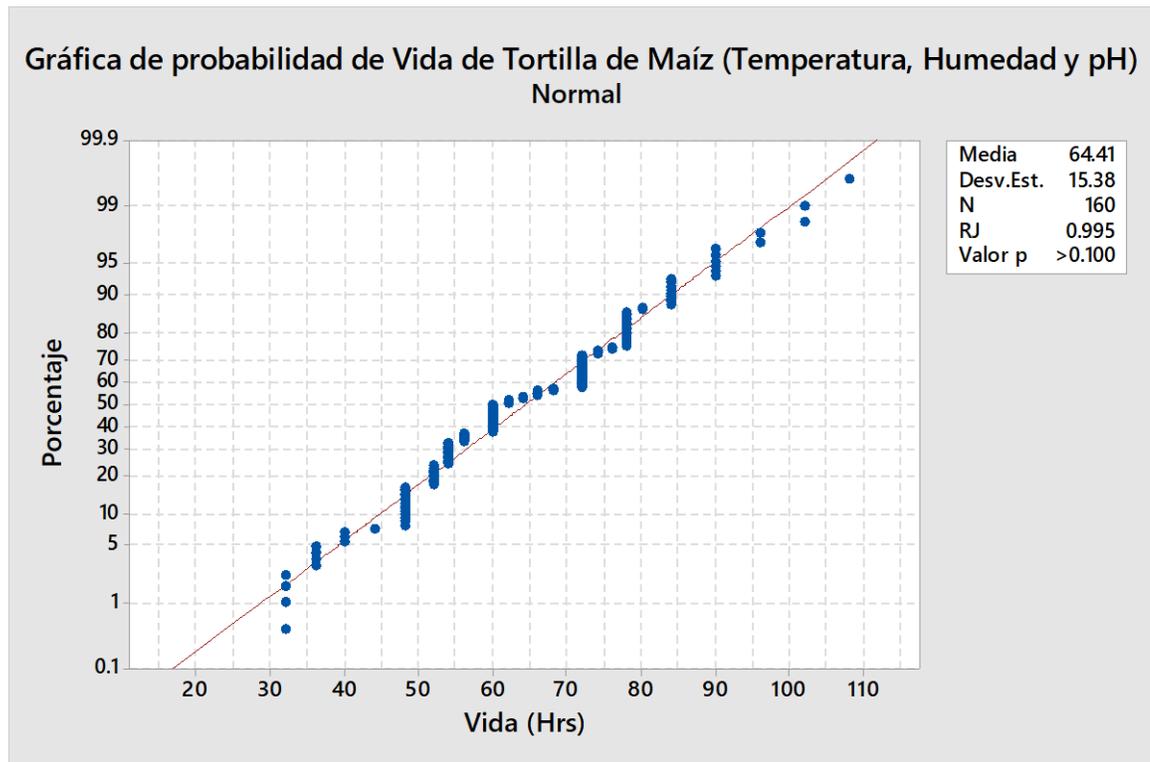


Figura 5.22. Gráfica de Probabilidad Para la Vida en Horas de la Tortilla de Maíz.

Con los datos anteriores se realiza un ANOVA, donde la respuesta es la vida en horas de la tortilla hasta donde muestra presencia visible de hongo, los factores son la temperatura, Humedad y pH, los resultados de la ANOVA se muestran en la tabla 5.25.

Tabla 5.25. Análisis de Varianza para Tortillas de Maíz (Temperatura, Humedad y pH)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor $p$
Temperatura	3	21639.1	7213.02	107.37	0.000
Humedad	3	4604.1	1534.69	22.84	0.000
pH	3	1312.5	437.49	6.51	0.000
Error	150	10077.2	67.18		
Falta de ajuste	6	105.6	17.59	0.25	0.957
Error puro	144	9971.6	69.25		
Total	159	37632.8			

El valor  $p$  calculado para los tres factores es cero, lo que indican que es significativa la temperatura, la humedad relativa y el pH, con respecto al tiempo de vida de la tortilla. Con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 73.22% y un  $R^2$  ajustado de 71.62%, se puede decir que se tiene buen ajuste lineal.

El MRPC es una alternativa estadística que nos permiten hacer la estimación de un riesgo tomando en cuenta el tiempo transcurrido hasta el desenlace. Este tipo de modelos son bastante útiles en el campo de la salud, especialmente en áreas relacionadas con enfermedades crónicas y enfermedades de alta letalidad, lo novedoso es usar este tipo de modelo en degradación de alimentos. El MRPC constituye un modelo multivariado que puede ponderar una curva de supervivencia con variables cualitativas o cuantitativas que pueden modificar el efecto final. La función de riesgo para el MRPC puede expresarse mediante la ecuación 3.78:

$$h(t|x) = h_0(t)\exp(x'\beta) \quad (3.78)$$

Donde  $h_0(t)$  es una función de riesgo no negativa y sin especificar, común a todos los sujetos del estudio, llamada función de riesgo base, y  $\beta$  es el vector de coeficientes del modelo. Es decir, el MRPC se utiliza fundamentalmente para comparar grupos y calcular cocientes de riesgo.

Los supuestos que deben cumplirse en el modelo de Cox son los siguientes (Pérez-Rodríguez et al. 2014):

1. Los datos censurados no están relacionados con la probabilidad de que ocurra el evento; es decir, en los sujetos cuyo desenlace desconocemos (sea cual sea la razón por la que se censuraron sus datos), se presume que la falta de datos no se relaciona con el evento del desenlace.
2. Las curvas de supervivencia para cada uno de los estratos (tratamientos u otra variable de agrupación) deben tener funciones de riesgo que sean proporcionales en el tiempo; esto debido a que es un modelo lineal y lo que significa es que cada cambio en el desenlace es proporcional a cada cambio en la variable de riesgo.

Se obtienen los siguientes resultados utilizando el software SPSS Statistics 22<sup>®</sup>.

Tabla 5.26. Resultados del Modelo de Riesgos Proporcionales de Cox.

Variables en la ecuación								
	$\beta$	SE	Wald	gl	Sig.	Exp( $\beta$ )	95.0% para Exp( $\beta$ )	
							Inferior	Superior
Temperatura	.357	.036	99.762	1	.000	1.429	1.332	1.533
Humedad	-.042	.008	29.897	1	.000	.958	.944	.973
pH	.359	.099	13.170	1	.000	1.431	1.179	1.737

La tabla 5.26 muestra los resultados del análisis de Cox. Como en todos los modelos de regresión obtenemos valores de  $\beta$ . En este caso el exponente de  $\beta$  corresponde al *Hazard Ratio* (HR). En este modelo, la temperatura, la humedad y el pH del producto son los factores de riesgo. La interpretación del HR sería de la siguiente manera: Cada vez que aumentamos la temperatura presenta 1.429 veces más riesgo

de que crezca hongo en la tortilla de maíz y se descomponga a las 60 horas. Cada unidad de pH hacia arriba incrementa el riesgo de crecimiento de hongo en 35%.

El HR también se pueden representar de forma gráfica para mostrar su relación con otras variables, donde la línea vertical en el número 1, es la no asociación. La figura 5.23 permite evaluar la significancia estadística a partir de los intervalos de confianza (IC) de 95 %, mostrados en la tabla 5.26. Cuando el IC 95 % no toca la unidad (línea vertical) representa un estudio que es estadísticamente significativo, es decir, la temperatura, la humedad relativa y el pH en el producto afecta significativamente a la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo.

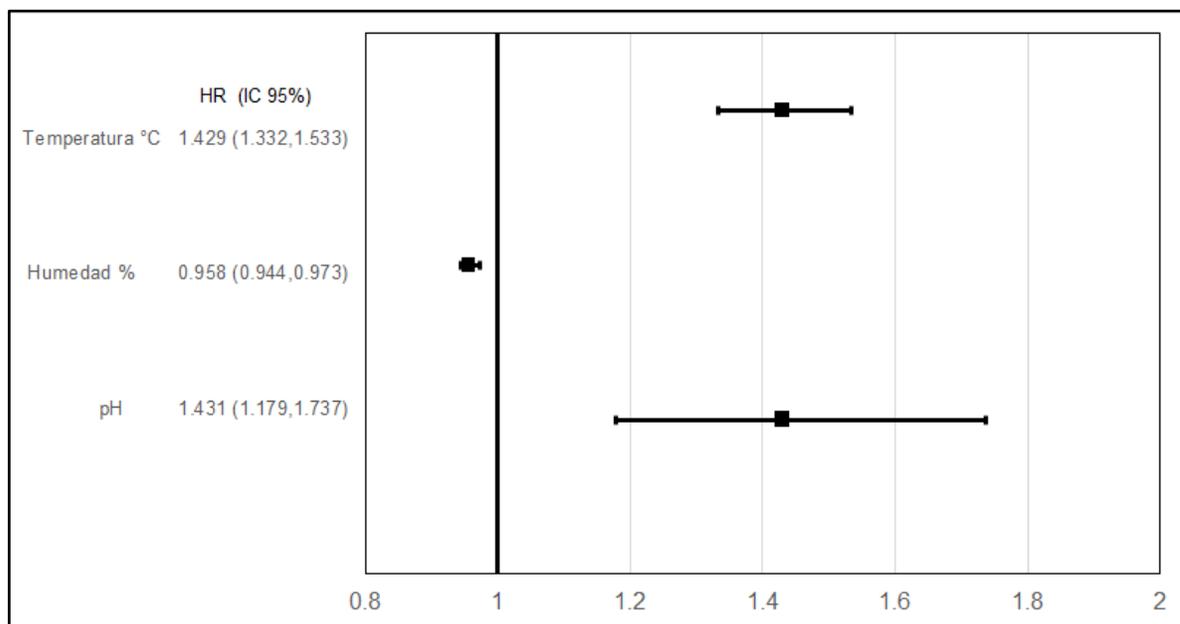


Figura 5.23. Covariantes que Afectan a la Tortilla de Maíz.

En la figura 5.24 se muestra la curva de supervivencia global en la que se representa gráficamente cómo se van descomponiendo las tortillas de maíz conforme pasa el tiempo. Para las 60 hrs de seguimiento menos del 20 % de las tortillas continúa en buenas condiciones, sin mostrar presencia visible de hongo.

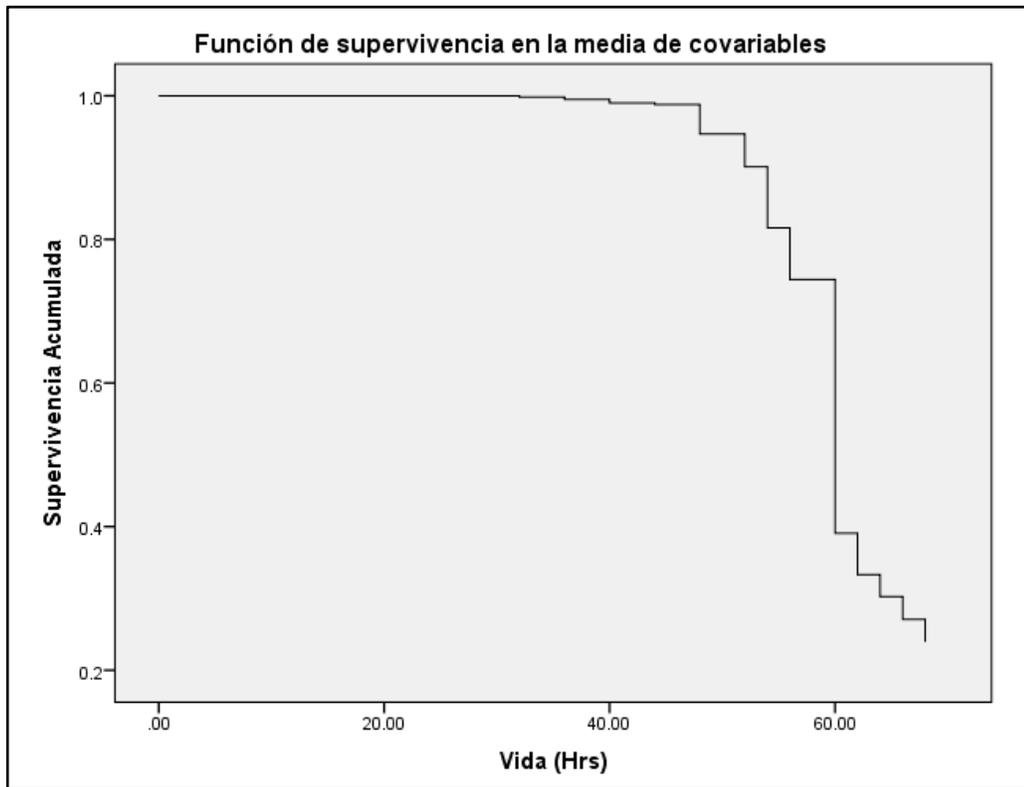


Figura 5.24. Curva de Supervivencia Global Ajustada por los Cofactores.

La figura 5.25 presenta las curvas de supervivencia ajustadas por la Humedad dentro del empaque y el pH para cada temperatura, es decir, podemos observar cómo incrementa la descomposición de las tortillas en temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35°C y 40°C. Es evidente que a mayor temperatura el producto se descompone más fácilmente. Para las 60 hrs todas las tortillas a 40 °C se han descompuesto, mientras que cerca del 80 % de las tortillas a 25 °C continúan en buen estado.

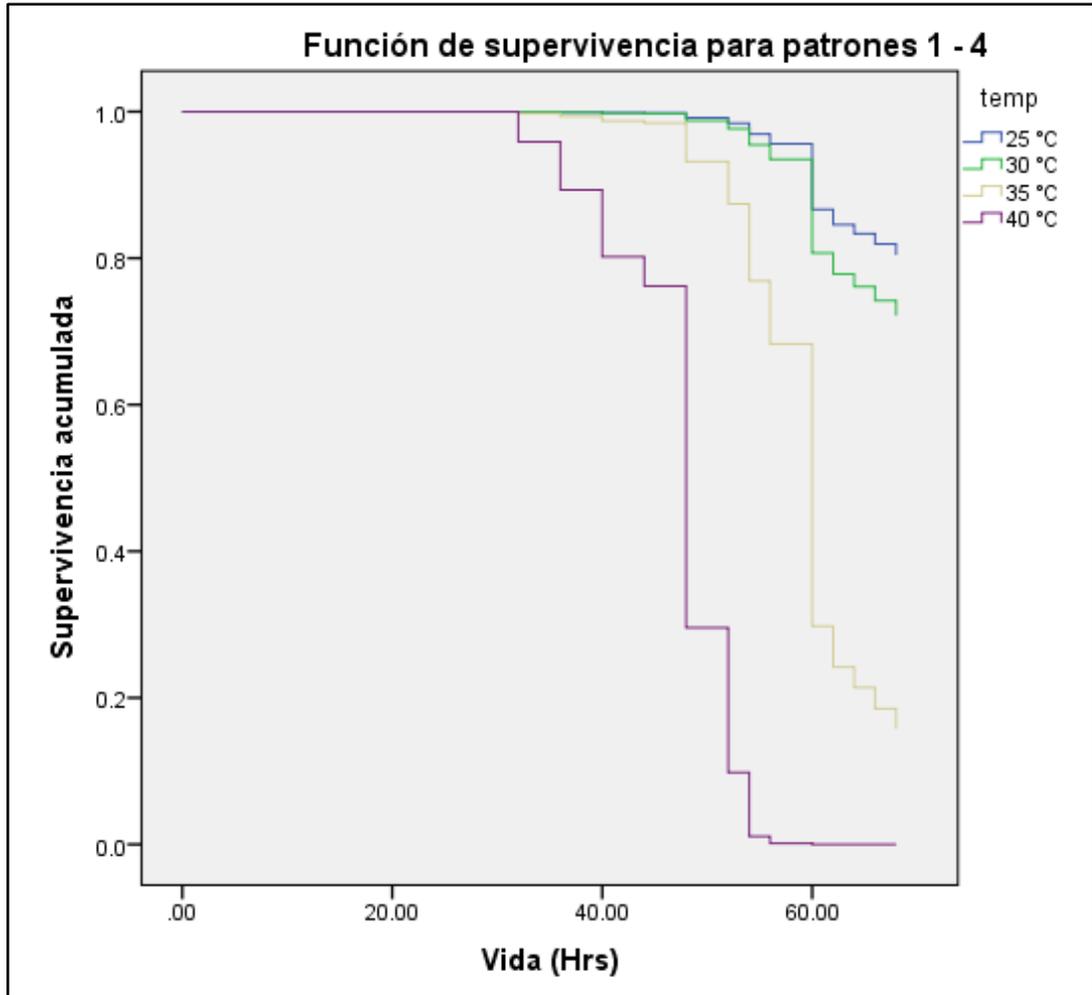


Figura 5.25. Curva de Supervivencia por Temperatura.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo, se dan respuestas a las preguntas de investigación y el análisis de las hipótesis planteadas, de igual manera, si se lograron los objetivos buscados. Así mismo, se presentan las conclusiones y recomendaciones resultantes del desarrollo, validación y aplicación de esta investigación.

### 6.1. Respuestas a las Preguntas de Investigación.

En esta sección, se analiza si se respondió a las dos preguntas de investigación planteadas en este estudio. La primera pregunta fue:

¿En que grado los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón inhiban el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* en tortilla de maíz?

Como se planteó en el capítulo 4, para poder determinar si los aceites esenciales inhibieron el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón frente a cepas de *Aspergillus flavus*, utilizando la técnica de dilución de caldo de los aceites a los cuales se les atribuyó actividad fungistática, las concentraciones evaluadas fueron desde; el 2.0% hasta el 0.3% de aceite esencial de Clavo de olor, del 2.0% hasta el 0.05% para el aceite esencial de hierba limón, y del 2% hasta el 0.02% para el aceite esencial de tomillo. En cinco días de incubación, se midió el área de crecimiento micelial. El mejor efecto antifúngico se observó en el aceite esencial de Tomillo rojo (*Thymus vulgaris*) con una concentración mínima de inhibición (CMI) de 0.05%. El aceite esencial de hierba limón (*Cymbopogon flexuosus*) mostró una concentración mínima de inhibición de 0.08%, mientras que el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) mostró el mayor porcentaje de concentración de 0.6%. Todos los aceites evaluados tuvieron efecto fungistático. Siendo el más efectivo por el porcentaje de

concentración el aceite esencial de Tomillo. Con respecto a la primera pregunta de investigación, la respuesta a esta sería sí, los aceites esenciales inhiben el crecimiento del hongo *Aspergillus Flavus* en diferentes concentraciones.

La segunda pregunta fue:

¿De qué manera la aplicación de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como conservador de alimentos en tortilla de maíz, no afecta significativamente las propiedades del producto y preserva la vida de anaquel?

La concentración mínima inhibitoria más baja que resultó fue de 0.05% del aceite esencial de tomillo en las pruebas *in vitro*. Razón por lo cual se decidió usar sólo el aceite esencial de Tomillo en las pruebas de vida acelerada (pruebas *in vivo*) para no afectar el sabor del producto final. Se usó un modelo de superficie de respuesta donde los factores fueron la concentración del aceite esencial de tomillo (0.05% - 0.1%), agregando tiempo de empaque del producto (0 min-30 min) con tres réplicas cada experimento y a una temperatura de almacenamiento de 28 °C. El análisis arrojó que la concentración ideal para la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo es de 0.09% con 31 minutos de tiempo de empaque, a esa concentración de aceite no se afectan las propiedades del producto y se preserva la vida de anaquel.

## **6.2. Análisis de las Hipótesis de Investigación**

En esta sección se realiza el análisis de las dos hipótesis planteadas, lo cual le da validez y fundamento a la investigación desarrollada. La primera hipótesis se planteó de la siguiente manera:

El uso de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como conservadores orgánicos preserva la vida de anaquel de la tortilla de maíz; inhibiendo el crecimiento de hongos.

Esta hipótesis de investigación, se planteó con la finalidad de determinar si al adicionar aceite esencial a la tortilla maíz este sirve como un conservador inhibiendo el crecimiento de hongos y preservando la vida de anaquel del producto. Se usó la dependencia de la temperatura empleando Arrhenius.

Usando la constante de velocidad de reacción ( $k$ ), la constante de los gases ideales ( $R$ ), la energía de activación ( $E_a$ ), el factor pre-exponencial ( $A$ ) y la temperatura absoluta en Kelvin ( $T$ ), se obtuvo la ecuación de una línea recta. Se comparó la eficiencia del aceite esencial de tomillo y del propionato de sodio y se obtuvo que 104 hrs es el tiempo pronosticado de vida para la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo al 0.09% a una temperatura de 21 °C, y 98 hrs es el tiempo pronosticado de vida para la tortilla de maíz adicionada con propionato de sodio al 0.2% a una temperatura de 21 °C y bajo las mismas condiciones. Con el desarrollo, aplicación y resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que la primera hipótesis planteada es verdadera y aceptada.

La segunda hipótesis se planteó de la siguiente manera:

A través de Metodologías de la Ingeniería de Confiabilidad, es posible evaluar la efectividad de los aceites esenciales de Clavo, Tomillo y Hierba limón como conservadores de alimentos, minimizando el efecto de crecimiento de hongos en la tortilla de maíz y maximizando su vida en anaquel.

La probabilidad de que la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo permanezca con la calidad requerida a lo largo del tiempo, fue evaluada considerando diferentes relaciones de vida-esfuerzo, una de ellas la dependencia con la temperatura, usando el modelo de Arrhenius, y la otra usando la relación temperatura-humedad. Se combinó la distribución de probabilidad de Weibull con

la relación Arrhenius obteniendo una función de distribución acumulada de tiempo de fallo  $F(t)$  y la probabilidad de que el producto cumpla con la función para la cual fue diseñado  $R(t)$ , teniendo como resultado la probabilidad acumulada de que el producto viva menos de 72 horas a 21 °C de 0.1764 y la probabilidad de que el producto cumpla satisfactoriamente con la función para la cual fue diseñado de 0.8235. De igual manera se combinó la distribución de probabilidad de Weibull con la relación temperatura-humedad obteniendo  $F(t)$  y  $R(t)$ , teniendo como resultado la probabilidad acumulada de que el producto viva menos de 72 horas de 0.2019 a 21 °C con una humedad relativa de 37% dentro del empaque y la probabilidad de que el producto cumpla satisfactoriamente con la función para la cual fue diseñado de 0.7980, por lo tanto, se concluye que la segunda hipótesis planteada es verdadera y aceptada.

### **6.3. Verificación del Objetivo de la Investigación**

El objetivo planteado en esta investigación fue el siguiente:

El objetivo general de esta investigación, es evaluar la eficiencia de los aceites esenciales de Clavo de olor, Tomillo y Hierba limón como bioconservadores mediante ingeniería de confiabilidad para determinar el tiempo en que se produce un deterioro en la calidad de la tortilla de maíz y así garantizar las condiciones de conservación del producto.

En los capítulos 3 y 4 se desarrolló la metodología y se determinó el modelo a usar en esta investigación, se determinó *in vitro* la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de clavo de olor, tomillo y hierba limón que inhibe el crecimiento del hongo *Aspergillus flavus*. A partir de este punto se hicieron pruebas *in vivo* donde se determinó las concentración optima de aceite esencial de Tomillo que necesita una tortilla de maíz, así como el tiempo de empaque ideal donde se maximiza la vida de anaquel del producto, una vez determinado la

concentración, se realizaron las pruebas de estrés necesarias para pronosticar la vida de la tortilla en diferentes condiciones, es decir, en diferentes escenarios donde se vería expuesto el producto, como temperatura, humedad, pH. La aplicación de la metodología y su implementación real confirma que el objetivo planteado se cumplió y el modelo presentado cumple con las expectativas para lo que fue propuesto.

#### **6.4 Conclusiones**

Se presentan varias conclusiones de las aportaciones al conocimiento de esta investigación. A nivel mundial la prevalencia del cáncer, alcanza cifras alarmantes. Los sistemas de salud están obligados a indagar las posibles causas y factores de riesgo asociados con la oncogénesis, las aflatoxinas pertenecen a la familia de las micotoxinas, que son sustancias químicas producidas por cepas toxigénicas de hongos, principalmente *Aspergillus flavus*. Estas sustancias pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en seres humanos. La ingestión de aflatoxinas puede producir una enfermedad conocida como aflatoxicosis. La aflatoxina B1 es el factor que acelera el cáncer, y es además el tipo de aflatoxina que provoca mayores cambios repentinos y permanentes en los genes. En México se han desarrollado normatividades para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 que indica que el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales es de 20 µg/kg tanto para el consumo humano como de animales; indica que el límite máximo de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es de 12 µg/kg. Sin embargo, es notable observar que no existe una regulación. Las aflatoxinas carecen de sabor y olor, son resistentes al calor, soportan entre 260 °C y 320 °C sin descomponerse y a procesos como cocción, ultrapasteurización, nixtamalización y fermentación.

Investigaciones han demostrado que los alimentos contaminados por aflatoxinas pueden ser detoxificados mediante el uso de sales inorgánicas como

el propionato de sodio, poniendo atención que las cantidades no sobrepasen los niveles permitidos por la normatividad, según la NOM-187-SSA1/SCFI-2002, no existe un límite máximo al agregar propionato de sodio a tortillas de maíz, lo deja a consideración de las buenas prácticas de fabricación del empresario.

Resultados de estudios, publicados en *Science Translational Medicine*, alertan que este conservador, podría estar relacionado al aumento de los niveles de varias hormonas que están vinculadas con el riesgo de obesidad, diabetes, entre otras enfermedades. Hoy en día la preocupación por consumir alimentos saludables y naturales, libres de aditivos y conservantes químicos ha incrementado, esto sirve de inspiración para poder soportar esta investigación.

Las propiedades de los aceites esenciales derivados de las plantas han sido reconocidas empíricamente durante siglos, pero científicamente confirmadas sólo recientemente, encontrando que pueden ser utilizados como agentes antimicrobianos y antioxidantes en los productos alimenticios tanto para prolongar su vida útil como para mantener y potenciar su calidad y características organolépticas. En esta investigación se usaron tres diferentes tipos de aceites esenciales, aceite esencial de tomillo, clavo de olor y hierba limón donde se evaluó su actividad fungistática. Se determinó la concentración mínima inhibitoria para los tres diferentes aceites esenciales mostraron potencial fungistático en diferentes concentraciones para inhibir el crecimiento micelial del hongo *Aspergillus Flavus*, siendo estas concentraciones 0.6% para el aceite esencial de Clavo de olor, 0.08% para el aceite esencial de Hierba limón, y 0.05% para el aceite esencial de Tomillo, siendo este último el de mayor efectividad dado por la concentración más pequeña que se usó para inhibir el crecimiento del hongo. Se usó sólo el aceite esencial de Tomillo para las pruebas *in vivo* en tortilla de maíz, usando un diseño factorial donde las variables fueron la concentración de aceite esencial y el tiempo de empaque, se encontró que la concentración ideal para la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo como bioconservador es de 0.09% con un tiempo de empaque de 31 min después de su fabricación.

Posteriormente se realizaron las pruebas de vida acelerada con tres diferentes modelos, relación temperatura donde se usa el modelo de Arrhenius pronosticando el tiempo de falla con respecto a la temperatura. En modelo Temperatura-Humedad, donde las variables de estrés son la temperatura y la humedad relativa para pronosticar el tiempo de falla y el modelo de riesgo proporcional de Cox.

A lo largo de este trabajo de investigación se ha podido ver la importancia que juega hoy en día el diseño de pruebas de vida aceleradas en el área de la industria, donde se requiere de una gran cantidad de productos para operar durante un largo periodo de tiempo. Las siguientes son algunas de las conclusiones relevantes al implementar los diferentes modelos. Para la relación Temperatura.

1) Los tiempos de fallos de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo son menores cuando esta es expuesta a temperaturas altas.

2) La vida útil estimada de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo (0.09%) a 21°C es de 104 hrs. En comparación con una tortilla de maíz adicionada con propionato de sodio al 0.2% es de 98 hrs. No existe evidencia suficiente que garantice que sea usado menos del 0.2% de propionato de sodio, debe tenerse en cuenta que todo se abandona a las buenas prácticas del fabricante.

3) Las relaciones de Arrhenius con los modelos, Exponencial, Weibull y Lognormal son aplicables para analizar los tiempos de fallos con la temperatura como variable aceleradora. Una vez realizado el análisis estadístico para seleccionar el mejor ajuste de entre los modelos Arrhenius-Exponencial, Arrhenius-Weibull y Arrhenius-Lognormal, éste último es el más adecuado para modelizar los tiempos de fallos de la tortilla de maíz. Pero para mayor comodidad se usó el modelo Arrhenius-Weibull porque en la industrial es uno de los modelos con mayor utilidad para establecer tiempos de garantías.

Con respecto la relación Temperatura-humedad

4) A partir de pruebas de vida acelerada con esfuerzos escalonados, se obtuvo la información necesaria para determinar el plan óptimo para una prueba acelerada con dos esfuerzos escalonados, temperatura y humedad siguiendo el procedimiento desarrollado en este trabajo de investigación.

5) Los tiempos de fallos de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo son menores cuando esta es expuesta a temperatura y humedad relativa alta.

6) La vida útil estimada de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo (0.09%) a 21°C y a un tiempo de empaque después de 30 min de enfriamiento (HR 37.4%) es de 104 hrs.

7) El factor de aceleración es de 2.72, es decir, una tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo al 0.09% empaquetada a los 30 min después de su fabricación y expuesta a 21 °C dura 2.72 veces más que una tortilla de maíz de las mismas características empaquetada inmediatamente después de su fabricación (0 min) y expuesta a 40 °C.

8) La probabilidad acumulada de que el producto viva menos de 72 horas a 21 °C es de 0.2019.

9) La función de confiabilidad calculada es de 0.7980, es decir la probabilidad de que el producto cumpla satisfactoriamente con la función para la cual fue diseñado, tortilla de maíz con aceite esencial de tomillo a 0.09% como bioconservador durante 72 horas a 21 °C a un tiempo de empaque de 30 min es del 79.8%.

## 6.5. Ventajas y Desventajas del Modelo Propuesto

El modelo propuesto, presenta las siguientes ventajas y desventajas en la implementación.

### 6.5.1. Ventajas del Modelo Propuesto

Las pruebas aceleradas, consisten en una variedad de métodos para acortar la vida de un producto o para alargar su degradación. Las principales ventajas son:

- 1) Con las pruebas de vida acelerada se pueden obtener datos rápidamente, los cuales, modelados adecuadamente y analizados, proporcionan información deseada sobre la vida de un producto bajo condiciones normales de uso.
- 2) Las fallas se presentan rápidamente en este tipo de pruebas, ya que los niveles de esfuerzo se incrementan sucesivamente.
- 3) Si la variable de estrés es la temperatura ( $T$ ), la relación de Arrhenius, es la ideal para pronosticar tiempos de fallos a diferentes temperaturas.
- 4) Si se modela la vida de un producto mediante una distribución Weibull y se combina con la relación Arrhenius, al modelo se le llama modelo Arrhenius-Weibull, describe la vida de una unidad como función del esfuerzo constante. El parámetro de forma de la distribución Weibull  $\beta$  provee una filosofía de falla y modela el tiempo de vida de la tortilla de maíz, que no varía con el esfuerzo.
- 5) La distribución Weibull es muy importante en teoría de la confiabilidad por ser una distribución muy versátil que puede aproximarse cualquier distribución.
- 6) Comprender y cuantificar los efectos de la temperatura, humedad y otros factores en la vida de la tortilla de maíz.
- 7) Desde el punto de vista estadístico permite realizar una mejor modelación del tiempo de vida del producto en estudio.
- 8) El modelo para prueba de vida acelerada ajusta adecuadamente a

los datos de vida de la tortilla de maíz, permitiendo dar una buena estimación de la distribución de vida, como lo muestran las pruebas realizadas en esta investigación. Con la estimación de la distribución de vida, se pueden tomar decisiones acerca de la garantía de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo.

### **6.5.2. Desventajas del Modelo Propuesto**

Durante la fabricación y almacenamiento los alimentos son expuestos a una gran variedad de condiciones ambientales. Factores tales como la temperatura, la humedad, el pH de la materia prima, la luz, entre otros y estos pueden desencadenar varios mecanismos de reacción que pueden conducir a la degradación del alimento, sin ser considerados en el análisis. Como consecuencia de estas reacciones los alimentos pueden alterarse causando el deterioro del producto pudiendo ser de origen químico, físico o microbiológico.

### **6.6. Recomendaciones**

- 1) Difundir la utilización de modelos matemáticos de supervivencia en alimentos.
- 2) Incentivar el uso de bioconservadores en alimentos, debido a que, de acuerdo a la literatura revisada los conservadores químicos, pueden provocar daños a la salud y no existe una regulación.
- 3) Se recomienda ampliamente establecer certidumbre en la utilización de conservadores químicos eliminando el término de buenas prácticas de fabricación.
- 4) Además del modelo desarrollado en esta investigación, se recomienda la aplicación para otro tipo de materiales involucrados en operaciones de degradación, tales como luz, materias primas, etc.

### **6.6.1. Futuras Investigaciones Sugeridas**

Como consecuencia de este trabajo de investigación se puede plantear algunas extensiones y estudios futuros:

- 1) Desarrollar nuevas modificaciones al modelo utilizando otras variables de estrés, como pH, diferentes tipos de materia prima, entre otras.
- 2) Realizar un análisis sensorial para modelar la probabilidad de rechazo del producto en diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo.
- 3) Considerar otros tipos de aceites esenciales.
- 4) Considerar otros tipos de productos, tales como “totopos”, harina para tortillas, tortillas tostadas, entre otros productos.
- 5) Realizar un estudio económico para saber la factibilidad de poner en marcha el proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aakshi K. (2016). The basics of Kaplan–Meier estimate. Journal of the Practice of Cardiovascular Sciences. 2 (3), 187-189. 10.4103/2395-5414.201381.
- Arámbula G., Barrón L., González J., Moreno E. y Luna G. (2001). Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(2), 187-194.
- Arámbula-Villa G., Gutiérrez-Árias E., Moreno-Martínez E. (2007). Thermal properties of maize masa and tortillas with different components from maize grains, and additives, Journal of Food Engineering, (80)1, 55-60.
- Arribalzaga, E. (2007). Interpretación de las curvas de supervivencia. Revista chilena de cirugía, 59(1), 75-83.
- Arroyo, I., Bravo, L., Llinás, H. y Muñoz, F. (2014). Distribuciones Poisson y Gamma: Una Discreta y Continua Relación. Prospectiva, 12(1), 99-107.
- Badui, S. (2006), *Química de los Alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Pearson, México.
- Bayle, F. y Mettas, A. (2010). Temperature acceleration models in reliability predictions: Justification & improvements. Proceedings - Annual Reliability and Maintainability Symposium (RAMS). 1-6, doi: 10.1109/RAMS.2010.5448028.
- Bello J. (2000), *Ciencia Bromatológica; Principios Generales de los alimentos*, Ediciones Díaz de Santos, S. A., España.
- Borges, R. (2005). Análisis de supervivencia de pacientes con diálisis peritoneal. Revista Colombiana de Estadística, 28(2), 243-259.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. Journal of medicine and life, 7 Spec No. 3(Spec Iss 3), 56–60.
- Boyce M. (1999), Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography, Journal of Chromatography A, (847) 1–2, 369-375.

- Bueno, S. y Bevilacqua, E. (2011). Desarrollando un sistema de predicción de distribuciones diamétricas para *Pinus occidentalis*, Sw. en la sierra, República Dominicana. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 17(1), 115-132. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.05.029>
- Castañón, R. y Solleiro, J. (2003). Estructura y perspectivas de la industria de alimentos en México. Comercio Exterior. 53, 114-127.
- Casp A. y Abril J. (2003), *Procesos de Conservación de Alimentos*, 2da. Ed., Editorial Mundi-Prensa, México.
- CODEX STAN 192-1995 (2018); Norma general para los aditivos alimentarios.
- Coppini D., Bowtell P., Weng C., Young P. y, Sönksen P. (2000). Showing neuropathy is related to increased mortality in diabetic patients a survival analysis using an accelerated failure time model, Journal of Clinical Epidemiology, 53 (5), 519-523.
- Cordón E. y Garcí F., (2016), *Tratamiento de la Supervivencia con Datos de Duración*, 2da. Ed. Servicio de Publicaciones Universidad de Huelva, ISBN 978 84 16061 280, España.
- Cox, D. R. (1972). Regression Models and Life-Tables. Journal oh the Royal Statistical society. Series B (Methodological). 34(2), 187-220.
- Cox, D. R. (1972). Partial Likelihood. Biometrika. 62(2), 269-276.
- Cubero N., Monferrer A. y Villalta J. (2002), *Aditivos Alimentarios, Colección Tecnológica de Alimentos*, Ediciones Mundi-Prensa, México.
- Díaz, M., y Glaves, A. (2020). Relación entre consumo de alimentos procesados, ultraprocesados y riesgo de cáncer: una revisión sistemática. Revista chilena de nutrición. 47(5), 808-821.
- Ebeling, C. (2010). *An Introduction to Reliability and Maintainability Engineering*, 2nd Edition, Waveland Press Inc. Illinois., USA, pp. 550.
- Elmadfa I., Muskat E. y Fritzsche D. (1991). *Guía de los Aditivos, Colorantes y Conservantes*. Ediciones Mundi-prensa, Colombia.
- Flores R., Borja A., Zamudio F., Fuentes M. y González E. (2001). Determinación a través de Pruebas Aceleradas, de la Vida Útil del Acabado para Exteriores

en Madera de Encino y Pino, Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 7(1), 99-105.

Floros, J. D., Newsome, R., Fisher, W., Barbosa-Cánovas G. V., Chen, H. Dunne, C., German, B., Hall, R., Heldman, D., Karwe, M., Knabel, S., Labuza, T., Lund, D., Newell-McGloughlin, M., Robinson, J., Sebranek, J., Shewfelt, R., Tracy, W., Weaver, C. y Ziegler, G. (2010). Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 9, 572-599.

García-Garibay M., Quintero-Ramírez R. y López-Munguía Canales A., (2004), Biotechnología Alimentaria; Editorial Limusa, México.

Godínez, J. y Ramírez, G. (2003). Censura y colinealidad en el modelo de regresión exponencial log-lineal Agrociencia, 37(3),267-275. Colegio de Postgraduados Texcoco, México. ISSN: 1405-3195.

Gomez G., Julià O. y Utzet F. (1992). *Survival analysis for left censored data*. (With discussion). 10.1007/978-94-015-7983-4\_16.

González, C., Galvis, D. y Hurtado, L. (2014). La distribución Beta Generalizada como un modelo de sobrevivencia para analizar la evasión universitaria. Estudios pedagógicos (Valdivia), 40(1), 133-144.

González, G., Pirovani, M., Piagentini, A., Ulín, F., Miranda, E., Osorio, R., Maldonado, E. y Salinas, R. (2016). Cinética de cambios sensoriales y vida de anaquel de carambola mínimamente procesada. Revista fitotecnia mexicana, 39(4), 393-402.

Gutiérrez, E., Rojas-Molina, I., Pons-Hernández, J., Guzmán, H., Aguas-Angel, B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios-Fonseca, A., Herrera, G. y Rodríguez M. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein maize as a function of cooking temperature. Cereal Chem. 84(2):186-194.

Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. y Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153, 1677-1692.

Huang, J. y Ma, S. (2010). Variable selection in the accelerated failure time model via the bridge method. Lifetime Data Analysis, 16 (2), 176–195.

Huang, J., Ma, S y Xie, H. (2006). Regularized Estimation in the Accelerated Failure Time Model with High-Dimensional Covariates. Biometrics, 62(3),813-820. doi:[10.1111/j.1541-0420.2006.00562.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2006.00562.x)

- Ibañez, A. (2011). *Análisis Estadístico de Valores Extremos y Aplicaciones*. (Tesis inédita de doctorado). Universidad de Granada, Granada, España.
- Ibañez F., Torre P. y Irigoyen A., (2000). Aditivos Alimentarios, Revista interna Universidad Pública de Navarra; Área de Nutrición de Navarra, 12, 145-147.
- Ibáñez-Pradas V., García-Vera C., (2008). Aditivos Alimentarios en el Comportamiento Hiperactivo en Niños. Evidencias Pediátricas; Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria. 4, 125-127. ISSN:1885-7388.
- Iles Ortiz F., Gutierrez Lesme O., (2016), Chemical Substances in Gas Drink Consumed in Colombia and its relation to health effects; Salud Historia Sanidad; (2)11, 51-66, ISSN: 1909-2407.
- Islam, M., Liro, M. y Del Valle, F. (1984). Mold Inhibition in Tortilla by Dimethyl Fumarate. Journal of Food Processing and Preservation. All Rights Reserved. Department of Food Science and Human Nutrition, University of Delaware, Newark. 8. 41-45.
- Jager, K., Van Dijk, P., Zoccali, C. y Dekker, F. (2008); The analysis of survival data: the Kaplan–Meier method, Kidney International, 74(5), 560-565.
- Kaczewe J., (2002), Toxicología de Glifosato: Riesgos para la Salud Humana. Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina. <http://tallerecologista.org.ar/sitio/areas-ind.php?sec=3> (recuperado 11 de marzo 2017).
- Kara M., Aydoğdu H. y Şenoğlu B. (2017) Statistical inference for  $\alpha$ -series process with gamma distribution. Communications in Statistics - Theory and Methods 46(13), 6727-6736.
- Kamel, C., Hafedh, H., Tarek, Z., Amel-Ben K., Mahmoud, R., Kacem, M. y Amina, B. (2007). The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phytother. Res.* 21, 501–506.
- Kaplan, E. L. y Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation for Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association. 53(282), 457-481.
- Kartsonaki, C. (2016). Survival analysis. Diagnostic Histopathology. 22(7), 263-270, <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2016.06.005>

- Kleinbaum, D. G. y Klein, M. (2012), *Survival Analysis: A Self-learning Text*, Tercera edición, Springer Science+ Business.
- Kundu, D. y Raqab, M. (2015) Estimation of  $R=P[Y<X]$  for three-parameter generalized Rayleigh distribution. Journal of Statistical Computation and Simulation, 85(4), 725-739, DOI: [10.1080/00949655.2013.839678](https://doi.org/10.1080/00949655.2013.839678)
- Lou-Arnal, L., Vercet-Tormo, A., Caverní-Muñoz, A., Medrano-Villarroya, C., Lou-Calvo, E., Munguía-Navarro, P. y Sanz-París, A. (2021) Impacto del consumo de alimentos ultraprocesados en la enfermedad renal crónica, *Nefrología*, ISSN 0211-6995, <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.11.013>.
- Lucijanic, M. y Petrovecki, M. (2012). Analysis of censored data. Biochemia medica. 22(2). 151-155.
- Manish, G., Pardeep, K. y Jugal, K. (2010). Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. International journal of Ayurveda research. 1(4), 274-278. [10.4103/0974-7788.76794](https://doi.org/10.4103/0974-7788.76794).
- Martínez, B., Figueroa, C., Sanchez, J., Gonzalez, J., Martinez, L. y Ruiz, T. (1996) *Method for the Preparation of Instant Fresh Corn Dough or Masa*. Número de Patente: 5,532,013. Julio 2.
- Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., y Vázquez, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Revista mexicana de fitopatología, 31(2), 126-146.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner y Stevenson, J. (2007), Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, The Lancet, 370(9598), 1560-1567, ISSN 0140-6736.
- Meeker, W. y Escobar, L., (1998). *Statistical Methods for Reliability Data*; Wiley-Interscience, USA.
- Mohd, I. N., Bashir A. F., Ebenezer J. y Javid A. B. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias; Asian Pacific Journal of Tropical Medicine; pp.535-538.
- Mongomery, D.C. (2012). *Design and Analysis of Experiments*. 8th. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. USA.

- Moubarac, J., Parra, D., Cannon, G. y Monteiro C. (2014). Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. Current Obesity Reports. 3(2), 256-272.
- Nelson, W. B. (2004); *Accelerated Testing: Statistical Models, Test Plans, and Data Analysis*; New York; John Wiley and Sons, USA.
- Nelson, K. y Labuza, T. (1994) Water activity and food polymer science: Implications state on Arrhenius and WLF models in predicting shelf life. Journal of Food Engineering. 22,271-290.
- NOM-051-SCFI/SSA1-2010 (Especificaciones Generales de Etiquetado para Alimentos y Bebidas No Alcohólicas Preenvasados-Información Comercial y Sanitaria).
- NOM-187-SSA1/SCFI-2002 (Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba).
- NOM-247-SSA1-2008 (Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba).
- Organización Panamericana de la Salud, OPS (2016). Modelo de Perfil de Nutrientes de la Organización Panamericana de la Salud. Washington.
- Ortega, F., Salcedo, E., Arrieta, R. y Torres, R. (2015). Efecto de la temperatura y concentración sobre las propiedades reológicas de la pulpa de mango variedad Tommy Atkins. Revista ION, 28(2), 79-92.
- Pardo Camacho A. L., (2009), Estudio de algunas propiedades estadísticas de un diseño caso control pareado que controla el efecto confusor de la edad de aparición de la enfermedad, Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Facultad de Ciencias - Escuela de Estadística.
- Parikh, J.K. y Desai, M.A. (2011). Hydrodistillation of essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. International Journal of Food Engineering 7: 1–8.

- Paternina-Sierra, K., Acevedo-Correa, D., y Montero-Castillo, P. (2018). Evaluación de la Vida Útil de una Pasta de Ajonjolí Azucarada mediante Pruebas Aceleradas. Información tecnológica, 29(4), 3-12.
- Pérez-Rodríguez, M., Rivas-Ruiz, R., Palacios-Cruz, L. y Talavera J. (2014), Juicio Clínico al Modelo de Riesgos Proporcionales de Cox., Revista y Boletines Científicos; Instituto Mexicano del Seguro Social, 52(4).
- Peterson, S. W., Horn, B.W., Ito, Y., y Goto, T. (2000). Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. pp. 447-458. In: Samson RA y Pitt JI. (eds.). Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C. y Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species; Journal of Medical Microbiology. 58, 1454–1462.
- Piña-Monarez, M., Ávila-Chávez, C., y Márquez-Luévano, C. (2015). Weibull accelerated life testing analysis with several variables using multiple linear regression. DYNA, 82(191), 156-162.
- Pohar, M. y Stare. J. (2006); Relative survival analysis in R; Computer Methods and Programs in Biomedicine. 81(3), 272-278. ISSN 0169-2607, <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2006.01.004>.
- Popkin, B. (2014). Nutrition, agriculture and the global food system in low and middle income countries, Food Policy, 47, 91-96. ISSN 0306-9192, <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.05.001>.
- ProMéxico, Fideicomiso de la Secretaría de Economía, (2018). La Industria de Alimentos Procesados, Producción y Consumo en México; <https://docplayer.es/74322157-La-industria-de-alimentos-procesados-en-mexico-febrero-2018.html>
- Quiñonez, G., De los Santos, H., Cruz, F., Velázquez, A., Ángeles, G., y Ramírez, G. (2015). Modelación dinámica de distribuciones diamétricas en masas mezcladas de Pinus en Durango, México. Madera y bosques, 21(2), 59-71.
- Rich, J. T., Neely, J. G., Paniello, R. C., Voelker, C. C., Nussenbaum, B., y Wang, E. W. (2010). A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. Official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 143(3), 331–336.

- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, J., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W. y Nierman, W.C. (2007). What can comparative genomics tell us about species concepts in genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, 59,11-17.
- Saieh, C. y Lagomarsino, E. (2009). Hipertensión Arterial y Consumo de sal en Pediatría. Revista Pediátrica., Clinical Overview. 80 (1): 11-20.
- Salim S. A., Sundus H. y Eshraq G. (2015). Investigation of Aflatoxins in Chips Manufactured from Corn; European Journal of Agriculture and Forestry Research 3(1), 37-43.
- Salinas, R., González, G., Pirovani, M. y Ulín, F. (2007). Modelación del deterioro de productos vegetales frescos cortados. Universidad y Ciencia, 23(2),183-196.
- Schaneberg, B, T. y Khan, I. A. (2002). Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 1345-1349.
- Sparling, Y., Younes, N., Lachin, J. y Bautista, O. (2006), Parametric survival models for interval-censored data with time-dependent covariates, Biostatistics, 7(4), 599-614.
- Suarez-Diéquez, T., González-Escalante, E., Reséndiz-Martínez, E. y Sánchez-Martínez, D. (2010) La Importancia de los Aditivos Alimentarios en los Alimentos Industrializados., Revista y Boletines Científicos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. ISSN2007-4573 (4),15-19.
- Sun-Og L., Gyung-Ja C., Kyoung-Soo J., He-Kyoung L., Kwang-Yun Ch., Jin-Cheol K; (2007). Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi; The Plant Pathology Journal. 23(2), 97-102.; Publisher. Korean Society of Plant Pathology
- Tineo, G. F., Agüero, P. Y. y Cambillo, M. E. (2006). Estimación de Kaplan Meier Bootstrap de la Curva de Supervivencia., PEQUISMAT Revista de la Fac. CC. MM. de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 9(2), 51-63.
- Valencia-Orozco, A., Parra-Lara, L., Martínez, J. y Tovar-Cuevas, J. (2019). Aplicación de modelos paramétricos alternativos para el análisis de supervivencia de pacientes con cáncer. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 36(2), 341-348.

- Valle-Vega, P. y Lucas-Florentino, B., (2000). Toxicología de Alimentos, Reporte técnico Instituto Nacional de Salud Pública y Centro Nacional de Salud Ambiental, México.
- Vázquez, M., Ávila, G., Hernández, A., Castillo, J. y Angulo, O. (2011). Evaluación Sensorial de Tortillas de Maíz Recién Elaboradas y Empacadas; Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (2)1, 161-167.
- Vega-Gálvez, A., Lara-Aravena, E. y Lemus-Mondaca, R. (2006); Isotermas de Adsorción en Harina de Maíz (*Zea mays* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; Sosiedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos; ISSN: 0101-2061. Vol. 26. pp. 821-827, Brasil.
- Velasco P. (2015) Modelo de Regresión de Cox y sus Aplicaciones Biosanitarias, Tesis de grado de Maestría. Universidad de Sevilla.
- Villada-Moreno J. (2010). *Conservadores Químicos Utilizados en la Industria Alimentaria*, Tesis, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Walpole, R., Myers, R., Myers, S. y Ye, K. (2007). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. 8va. Ed. Pearson, Prentice Hall.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S. y Soontornantasart, T. (1996). Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. Phytotherapy Research 10, 551-554.
- Yang, G. (2007). *Life Cycle Reliability Engineering*; John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Xie, J. y Liu, C. (2005). Adjusted Kaplan–Meier estimator and log-rank test with inverse probability of treatment weighting for survival data. *Statistics in medicine*. 24, 3089-3110. doi:[10.1002/sim.2174](https://doi.org/10.1002/sim.2174).
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. y Aksoy, H. (2011). The Evaluation of the Genotoxicity of Two Food Preservatives: Sodium Benzoate and Potassium Benzoate. International Journal Food and chemical toxicology. 49(4), 763-769. ISSN 0278-6915.

## ANEXO

Tabla A. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Temperatura, Humedad y pH.

Temperatura °C	Humedad Relativa %	pH	Vida Hrs.	Bad-Good
25	63	3	60	0
25	63	3	72	1
25	63	3	72	1
25	63	3	78	1
25	63	3	72	1
25	63	3	72	1
25	63	3	54	0
25	63	3	72	1
25	63	3	78	1
25	63	3	72	1
25	52	4	60	0
25	52	4	108	1
25	52	4	60	0
25	52	4	76	1
25	52	4	102	1
25	52	4	78	1
25	52	4	80	1
25	52	4	60	0
25	52	4	76	1
25	52	4	96	1
25	37	5	84	1
25	37	5	72	1
25	37	5	60	0
25	37	5	90	1
25	37	5	72	1
25	37	5	90	1
25	37	5	78	1
25	37	5	78	1
25	37	5	90	1
25	37	5	66	0
25	35	6	72	1
25	35	6	84	1

Tabla A. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Temperatura, Humedad y pH (Continuación).

Temperatura °C	Humedad Relativa %	pH	Vida Hrs.	Bad-Good
25	35	6	78	1
25	35	6	84	1
25	35	6	72	1
25	35	6	90	1
25	35	6	84	1
25	35	6	90	1
25	35	6	72	1
25	35	6	72	1
30	63	4	68	0
30	63	4	74	1
30	63	4	62	0
30	63	4	62	0
30	63	4	74	1
30	63	4	62	0
30	63	4	68	0
30	63	4	80	1
30	63	4	60	0
30	63	4	62	0
30	52	5	60	0
30	52	5	72	1
30	52	5	84	1
30	52	5	72	1
30	52	5	60	0
30	52	5	72	1
30	52	5	72	1
30	52	5	60	0
30	52	5	72	1
30	52	5	78	1
30	37	6	72	1
30	37	6	78	1
30	37	6	60	0
30	37	6	60	0
30	37	6	60	0
30	37	6	84	1
30	37	6	78	1

Tabla A. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Temperatura, Humedad y pH (Continuación).

Temperatura °C	Humedad Relativa %	pH	Vida Hrs.	Bad-Good
30	37	6	60	0
30	37	6	78	1
30	37	6	78	1
30	35	3	78	1
30	35	3	84	1
30	35	3	78	1
30	35	3	78	1
30	35	3	72	1
30	35	3	74	1
30	35	3	90	1
30	35	3	96	1
30	35	3	102	1
30	35	3	84	1
35	63	5	48	0
35	63	5	48	0
35	63	5	60	0
35	63	5	54	0
35	63	5	54	0
35	63	5	48	0
35	63	5	48	0
35	63	5	54	0
35	63	5	48	0
35	63	5	48	0
35	52	6	54	0
35	52	6	54	0
35	52	6	60	0
35	52	6	64	0
35	52	6	54	0
35	52	6	60	0
35	52	6	54	0
35	52	6	60	0
35	52	6	54	0
35	52	6	64	0
35	52	6	54	0
35	37	3	54	0
35	37	3	66	0

Tabla A. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Temperatura, Humedad y pH (Continuación).

Temperatura °C	Humedad Relativa %	pH	Vida Hrs.	Bad-Good
35	37	3	54	0
35	37	3	78	1
35	37	3	72	1
35	37	3	78	1
35	37	3	72	1
35	37	3	84	1
35	37	3	54	0
35	37	3	60	0
35	35	4	78	1
35	35	4	66	0
35	35	4	78	1
35	35	4	60	0
35	35	4	72	1
35	35	4	72	1
35	35	4	66	0
35	35	4	60	0
35	35	4	60	0
35	35	4	60	0
40	63	6	40	0
40	63	6	32	0
40	63	6	32	0
40	63	6	36	0
40	63	6	32	0
40	63	6	36	0
40	63	6	32	0
40	63	6	40	0
40	63	6	36	0
40	63	6	36	0
40	52	3	48	0
40	52	3	40	0
40	52	3	52	0
40	52	3	56	0
40	52	3	44	0
40	52	3	52	0
40	52	3	48	0

Tabla A. Datos de Vida de la Tortilla de Maíz Adicionada con Aceite Esencial de Tomillo, Temperatura, Humedad y Ph (Continuación).

Temperatura °C	Humedad Relativa %	pH	Vida Hrs.	Bad-Good
40	52	3	56	0
40	52	3	54	0
40	52	3	56	0
40	37	4	52	0
40	37	4	56	0
40	37	4	48	0
40	37	4	56	0
40	37	4	48	0
40	37	4	52	0
40	37	4	56	0
40	37	4	48	0
40	37	4	52	0
40	37	4	48	0
40	35	5	52	0
40	35	5	52	0
40	35	5	56	0
40	35	5	48	0
40	35	5	48	0
40	35	5	52	0
40	35	5	52	0
40	35	5	52	0
40	35	5	52	0
40	35	5	48	0

## CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En Ciudad, Juárez, Chihuahua, México, siendo el día 1 de septiembre del año 2021, la que suscribe, M.C. Inocente Yuliana Meléndez Pastrana, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, con número de control D98090563, adscrita a la División de Estudios de Posgrado e Investigación, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Manuel Alonso Rodríguez Morachis y cede los derechos del trabajo titulado "Análisis de Aceites Esenciales como Bioconservadores, a Través de la Teoría de Confiabilidad", al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Ciudad Juárez para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el consentimiento expreso de la autora y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [yuliana.mp@cdjuarez.tecnm.mx](mailto:yuliana.mp@cdjuarez.tecnm.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above the printed name.

M.C. Inocente Yuliana Meléndez Pastrana