

## Crecimiento de *Saccharomyces boulardii* con agavinas acetiladas como fuente de carbono

Londoño-Moreno Alejandro<sup>1\*</sup>, Buitrago-Arias Carolina<sup>2</sup>, Ávila-Reyes Sandra V.<sup>2</sup>, Jiménez-Aparicio Antonio R.<sup>2</sup>, Arenas-Ocampo Martha L.<sup>2</sup>, Camacho-Díaz Brenda H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad de Ciencias de la Salud, Pregrado en Biotecnología. Carrera 78#65 – 46, Medellín, Antioquia. C.P. 050034, Colombia.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional - CeProBi. Carretera Yautepec-Jojutla, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos. C.P. 62731. México.

\*Correspondencia: alejo96m@gmail.com

### Recibido:

16/marzo/2020

### Aceptado:

25/octubre/2020

### Palabras clave:

Agavinas,  
fermentabilidad,  
probióticos

### Keywords:

Agavins,  
fermentability,  
probiotics

### RESUMEN

Las agavinas son polímeros de fructosa provenientes del agave. Poseen enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6), característica que no permite su hidrólisis por enzimas digestivas y las clasifica como oligosacáridos no digeribles. Estas moléculas han tomado relevancia debido a sus diferentes aplicaciones como encapsulantes de componentes bioactivos para liberarlos en sitios específicos y su capacidad prebiótica. Las bacterias del intestino grueso y cepas probióticas como *Saccharomyces boulardii* pueden fermentar las agavinas, generando cambios positivos en la microbiota. En esta investigación se evaluó la fermentabilidad de agavinas nativas, comerciales y acetiladas por la levadura probiótica *S. boulardii*, con el fin de compararlas como fuentes de carbono. Como resultado se obtuvo que el desarrollo celular en el medio con agavinas acetiladas fue mayor ( $9,0 \times 10^6$  UFC/mL) respecto a las comerciales ( $5,7 \times 10^6$  UFC/mL) y nativas ( $7,5 \times 10^5$  UFC/mL), sin embargo, su crecimiento no fue mayor al medio con glucosa ( $3,5 \times 10^7$  UFC/mL).

### ABSTRACT

Agavins are polymers of fructose from agave that have  $\beta$  (2-1) and  $\beta$  (2-6) bonds, a characteristic that makes them resistant to hydrolysis by digestive enzymes and are classified non-digestible oligosaccharides. Currently, agavins have become relevant due to their different applications as an encapsulant of bioactive compounds to release them at specific sites and for their prebiotic characteristics. Bacteria from the large intestine and probiotic strains such as *Saccharomyces boulardii* can ferment agavins, generating positive changes in the microbiota. In this research, the fermentability of native, commercial and acetylated agavins by the probiotic yeast *S. boulardii* was evaluated, in order to compare them as carbon sources. As a result, it was obtained that the cell growth in the medium with acetylated agavins was higher ( $9,0 \times 10^6$  CFU/mL) compared to commercial ones ( $5,7 \times 10^6$  CFU/mL) and native agavins ( $7,5 \times 10^5$  CFU/mL), however, its growth was not greater than the medium with glucosa ( $3,5 \times 10^7$  CFU/mL).

## Introducción

Las agavinas son polímeros de fructosa presentes en plantas de agave, su conformación química y grado de polimerización (GP) dependen del tiempo de vida de la planta; aumentando su complejidad mientras aumenta la edad de esta. (Huazano *et al.*, 2017) Para ejemplares con edades entre los dos y cuatro años el contenido de agavinas es alto y el GP es bajo, además, presentan estructuras químicas más simples, en comparación con plantas con edades comprendidas entre cinco y siete años, que poseen gran cantidad de agavinas con alto GP y estructuras químicas altamente ramificadas. (Huazano y López, 2015).

Estos polímeros poseen enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6), característica que los hace resistentes a hidrólisis por parte de enzimas digestivas durante su paso por el estómago y el intestino delgado, por lo cual se clasifican como oligosacáridos no digeribles (Alvarado, 2020). Lo anterior, permite su llegada hasta al ciego y el colon, donde la microbiota presente en estos sitios puede fermentarlas.

En los últimos años, las agavinas han tomado relevancia debido a sus diversas aplicaciones como encapsulantes de componentes bioactivos, para liberarlos en sitios específicos (Miramontes *et al.*, 2019; Buitrago, 2017) y su capacidad prebiótica, representando beneficios para la salud del huésped al inducir cambios en la composición y actividad de la microbiota presente en el intestino (Alvarado *et al.*, 2020), además de ser empleadas como fuente de carbono para cepas probióticas. Según la FAO/OMS, los probióticos son microorganismos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped mediante su crecimiento y/o actividad en el cuerpo humano, algunos ejemplos de estos microorganismos son los géneros de bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (FAO, 2011), al igual que *Saccharomyces boulardii*, única levadura probiótica aprobada por la FDA (Ávila *et al.*, 2016) y reconocida por poseer una resistencia intrínseca a los antibióticos, no presentar patogenicidad, ser resistente a la acidez gástrica, a altas temperaturas y a la proteinólisis (Zamora, 2011; Rojas, 2018). Estas características le permiten permanecer en cantidades constantes de manera viable dentro del tracto gastrointestinal, además de presentar actividad inhibitoria al crecimiento de microorganismos patógenos y fermentar las agavinas, promoviendo la producción de ácidos grasos de cadena corta y representando beneficios para la salud gastrointestinal. (Buts, 2005; Bravo *et al.*, 2008; Zamora, 2011; Ávila *et al.*, 2016; Rojas, 2018).

Si bien, las agavinas han sido empleadas en diferentes aplicaciones, como se mencionó anteriormente, su

naturaleza hidrófila limita sus usos, por tal motivo se han reportado ensayos para realizar modificaciones químicas con grupos hidrófobos y de esta manera generan polisacáridos repelentes al agua, con afinidad hacia componentes menos polares. (Miramontes *et al.*, 2020; Buitrago, 2017). Sin embargo, es necesario explorar como afectan estas modificaciones químicas su fermentabilidad por parte de microorganismos probióticos. En este trabajo se evaluó la capacidad de *Saccharomyces boulardii* para fermentar agavinas modificadas por acetilación.

## Metodología

Este proyecto se realizó en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi), del Instituto Politécnico Nacional (IPN), ubicado en la ciudad de Yautepec, Morelos, México. Apoyado por el laboratorio de Microscopía e Imagenología, la planta piloto de extracción de polisacáridos de agave (patente en trámite MX/a/2015/016512) y demás instalaciones del centro de investigación.

## Materia prima

Las agavinas de la especie *Agave angustifolia* Haw fueron extraídas mediante un sistema modular piloto diseñado por investigadores del CeProBi, (patente en trámite MX/a/2015/016512). Una vez obtenidos los extractos líquidos se realizó la deshidratación mediante secado por aspersión, con secador de disco rotatorio a temperaturas de ingreso a 200°C y temperatura de salida a 70°C. Las agavinas fueron acetiladas empleando la metodología de varios autores (Wu & Lee, 2000; Robert, *et al.*, 2012; Walz, *et al.*, 2018; Miramontes, *et al.*, 2020).

## Activación de cepa probiótica (*Saccharomyces boulardii*)

Para la recuperación de la cepa probiótica y la obtención del inóculo inicial se vertió el contenido de una cápsula comercial de *Saccharomyces boulardii* en 50 mL de caldo YPD estéril (NaCl 0,5 g/L, glucosa 10 g/L, peptona de caseína 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L), en caso de requerir medio sólido se empleó agar-agar (15 g/L), pH  $\pm$  6,7. La temperatura de incubación a 37°C y la agitación a 75 rpm se mantuvieron constantes durante todo el proceso, por un periodo de 12 horas.

Posteriormente se tomaron dos muestras; la primera, de 5 mL, para inocular en 100 mL de caldo YPD estéril e incubar en las condiciones anteriormente descritas, por 12 horas. La segunda muestra, de 100  $\mu$ L, fue diluida en 900  $\mu$ L de PBS estéril (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L), hasta llegar a la dilución 10<sup>-6</sup> para sembrar cada una en agar YPD empleado la técnica de microgota (Miles *et al.*, 1938); esta técnica consiste en sembrar en una misma caja de Petri, dividida en 6

secciones iguales, 10 µL de cada dilución haciendo pequeñas gotas con ayuda de una micro-pipeta sobre el medio de cultivo. Esto permite verificar la reactivación de la levadura y adicionalmente descartar la presencia de microorganismos contaminantes. Adicionalmente se realizó la observación de una muestra en fresco en un microscopio óptico (Figura 1.B.).

Pasadas las 12 horas, se tomaron de nuevo 5 mL de muestra de levadura para inocular en 100 mL de caldo YPD estéril y fermentar por otro periodo de 12 horas. Pasado este tiempo se realizó la siembra en agar YPD, de la misma manera que se describió anteriormente. Esta fermentación fue empleada finalmente como cultivo inicial para el proceso experimental.

Como paso final se tomaron 12 muestras de 1000 µL de la levadura reactivada en tubos eppendorf estériles, se sometieron a centrifuga y el sobrenadante fue descartado. Se adicionó 500 µL de medio YPD estéril y 500 µL de glicerina estéril para conservar el microorganismo en congelación.

### Preparación de medios de cultivo

Los caldos YPD fueron preparados bajo las mismas condiciones y variando las fuentes de carbono; glucosa (CG), agavinas nativas (AN), comerciales (AC) y modificadas químicamente por acetilación (AM1 y AM2) para indagar el comportamiento de *Saccharomyces boulardii*. Cabe destacar que los medios de cultivo con agavinas modificadas presentan un menor volumen de preparación debido a la disponibilidad de materia prima en este proceso exploratorio de fermentabilidad.

Las agavinas modificadas fueron lavadas con 10 mL de agua desionizada y centrifugadas a 11700 rpm, por 10 minutos a 10 °C. El lavado se realizó hasta que el olor a ácido acético, que provenía de la modificación química, desapareció. Posteriormente fueron congelados 24 horas para ser liofilizados y diluidas en el medio de cultivo para proceder a la esterilización en autoclave.

### Inoculación y fermentación

Para los medios sin (SG) y con glucosa (CG), agavinas nativas (AN) y comerciales (AC) el inóculo de la levadura fue al 2%, para el caso de las agavinas modificadas (AM1 y AM2), el inóculo se realizó al 5%. Las condiciones de incubación se dieron a 37 °C, por 24 horas a una agitación de 75 rpm. Fueron extraídas muestras a las 0, 6, 12 y 24 horas para determinar el crecimiento del microorganismo a través del conteo en placa y así registrar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) presentes a la hora del muestreo.

### Crecimiento celular

Para determinar el crecimiento celular se emplearon placas de agar YPD, sembrando por microgota (Miles *et al.*, 1938) diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup>, realizadas en tubos eppendorfs con PBS estéril para los 3 tiempos evaluados.

Se realizaron siembras directas desde el caldo de cultivo a placas de medio YPD para los fructanos de agave modificados, con la intención de verificar la presencia de la levadura en la muestra encubada a lo largo del tiempo. Las placas se mantuvieron a 37°C, el conteo de las placas se realizó 24 horas posteriores a la siembra.

### Análisis estadístico

El análisis se realizó empleando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 26.0, comparando las medias del crecimiento entre los 4 tiempos muestreados y buscando diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con relación al crecimiento celular.

### Resultados y discusión

#### Activación de la cepa probiótica (*Saccharomyces boulardii*)

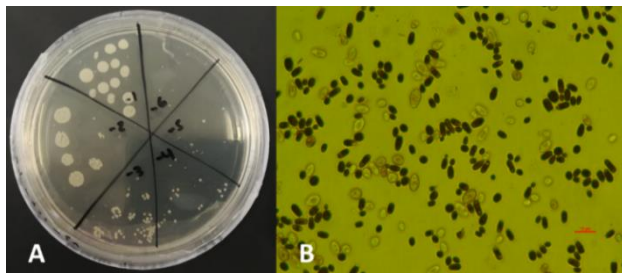
El crecimiento de la cepa de levadura comercial (Floratil® Merk, S.A. de C.V., México) se desarrolló por un periodo de 36 horas en total.

La concentración de microorganismos sembrado en las placas, empleando diluciones seriadas y la técnica de microgota fue calculado empleando la ecuación 1 Para determinar la concentración de colonias en las muestras sembradas por microgota.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\# Colonias\ contadas * Factor\ de\ dilución\ (positivo)}{mL\ de\ muestra\ inoculados}$$

Ecuación 1

El conteo de las muestras sembradas en placa se dio 24 horas después de la inoculación con el cultivo madre y la concentración inicial del cultivo se encontró en 1,7x10<sup>7</sup> UFC/mL, se encontraron células de aproximadamente 7 µm de tamaño, con su característica forma ovoide, como se muestra en la figura 1.



**Figura 1. A.** Crecimiento en placa del inóculo inicial, sembrado a través del método de microgota con 10  $\mu\text{L}$  de muestra por cada dilución, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . **B.** Células de *Saccharomyces boulardii* de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ , teñidas con cristal violeta y observadas bajo un aumento de 40x, con ayuda de un filtro azul bajo un microscopio Nikon Eclipse 80i.

### Crecimiento celular

El crecimiento celular fue medido a las 6, 12 y 24 horas haciendo conteo de las colonias presentes en los medios de cultivo suplementado con las diferentes fuentes de carbono. Las medias del aumento de biomasa de *S. boulardii* a través del tiempo se reportan en la tabla 1, estas presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a partir de las 24 horas. Por lo anterior, el crecimiento a las 24 horas fue tomado en cuenta para comparar el desarrollo celular de la levadura al estar en presencia de las diferentes fuentes de carbono disponibles en el medio de cultivo.

**Tabla 1.** Media del crecimiento celular a las 0, 6, 12 y 24 horas de la fermentación con las fuentes de carbono evaluadas.

Crecimiento (UFC/mL)	Horas			
	0 Horas Media	6 Horas Media	12 Horas Media	24 Horas Media
	$3,7 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1,6 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$4,3 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1,1 \times 10^7$ <sup>b</sup>

Nota: los valores de la misma fila y subtabla que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes en  $p < ,05$  en la prueba bilateral de igualdad para medias de columna. Las casillas sin subíndice no se incluyen en la prueba. Las pruebas asumen varianzas iguales.

La relación entre el crecimiento celular a las 24 horas y la fermentación de las diferentes fuentes de carbono se reportan en la tabla 2, donde se compara estadísticamente el aumento de biomasa entre los sustratos disponibles. En ausencia de glucosa (SG) y cuando la fuente de carbono presente en el medio de cultivo eran agavinas nativas (AN) *S. boulardii* no presenta diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el crecimiento, lo que indica que el microorganismo presenta dificultades para degradar de este polisacárido. Por otro lado, al relacionar las agavinas nativas (AN) y las comerciales (AC) se hayan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) relacionadas con el crecimiento celular de *S. boulardii*, siendo mayor el crecimiento a las 24 horas en el medio de cultivo con AC paralelo con las AN.

Al comparar la fermentación de las agavinas modificadas 1 (AM1) con las agavinas comerciales (AC) y el medio de

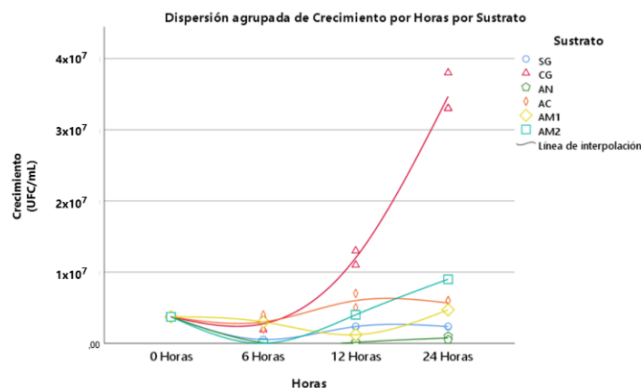
sin glucosa (SG) tampoco se hayan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p > 0,05$ ). En el caso del medio suplementado con glucosa (CG) y el medio suplementado con agavinas modificadas 2 (AM2) presentan diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ), respecto a los otros tratamientos. Lo anterior brinda acercamientos a la capacidad de la *S. boulardii* para fermentar las agavinas modificadas.

**Tabla 2.** Concentración celular en UFC/mL a las 24 horas de los sustratos evaluados como fuentes de carbono para el crecimiento de *S. boulardii*.

Crecimiento (UFC/mL)	Horas	24 Horas	Sustrato					
			SG Media	CG Media	AN Media	AC Media	AM1 Media	AM2 Media
			$2,4 \times 10^6$ <sup>a,d</sup>	$3,5 \times 10^7$ <sup>b</sup>	$7,5 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$5,7 \times 10^6$ <sup>c</sup>	$4,7 \times 10^6$ <sup>c,d</sup>	$9,0 \times 10^6$ <sup>e</sup>

Nota: los valores de la misma fila y subtabla que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes en  $p < ,05$  en la prueba bilateral de igualdad para medias de columna. Las casillas sin subíndice no se incluyen en la prueba. Las pruebas asumen varianzas iguales.

Como lo reporta Rojas, R (2018) las principales fuentes de carbono empleadas por las levaduras son hidratos de carbono simples, como los monosacáridos o disacáridos. *S. boulardii* presentó una alta capacidad para fermentar glucosa, como se muestra en la figura 2, el crecimiento celular se dio hasta casi  $3,4 \times 10^7$  UFC/mL, debido a que su metabolismo celular se encuentra adaptado a este sustrato al ser reactivado metabólicamente en un medio de cultivo que contuviera este carbohidrato dentro de sus componente.



**Figura 2.** Crecimiento celular de *S. boulardii* en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono. Muestras tomadas a las 0, 6, 12 y 24 horas. El tiempo 0 es la media de todos los tratamientos.

Por otro lado, la tasa de crecimiento presentadas al someter el microorganismo a medio de cultivo con agavinas nativas (AN) fueron las más bajas, esto debido probablemente a la complejidad estructural presente en las agavinas nativas extraídas de la planta. Como lo menciona Velázquez *et al.*, (2014) características como el grado de polimerización y la estructura del compuesto fermentado genera cambios en el comportamiento de los microorganismos probióticos evaluados. En este caso la estructura de las agavinas que se encuentran en el mercado y que son aptos para el consumo humano

podieron jugar un papel importante en la fermentabilidad por parte de la levadura, siendo este medio de cultivo el tercero en ganancia de biomasa a las 24 horas, presentando un crecimiento de aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC/mL, comparado con los medios presentados en la figura 2, igualmente la capacidad de fermentación de polisacáridos esta relacionado con la maquinaria enzimática que tenga el microorganismo (Rojas R., 2018).

## Conclusiones

Las características estructurales de estos compuestos posiblemente complejizan su fermentación por parte de este microorganismo. Las agavinas modificadas (AM2) presentaron un mayor nivel de crecimiento, igualmente las agavinas comerciales. Por otro lado, las agavinas nativas (AN) presentaron menor fermentación. Sin embargo, en todos los medios de cultivo con presencia de agavinas *S. boulardii* presentó crecimiento a las 24 horas, lo que indica la capacidad de la levadura para emplear este sustrato.

El comportamiento de esta levadura en la fermentación y la disposición del crecimiento celular en la gráfica mostrarían que el microorganismo requiere un mayor tiempo en el medio de cultivo para posiblemente acoplar su maquinaria enzimática para emplear estos polisacáridos como fuente de carbono.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Centro de desarrollo de productos bióticos-CeProBi del IPN por permitir la realización de este proceso experimental.

## Referencias

Alvarado Jasso G.M. (2020). Estudio de la fermentabilidad colónica in vitro e in vivo en un modelo murino de obesidad de la mezcla de agavinas y harina de plátano verde. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional IPN, México.

Alvarado Jasso G.M., Camacho Díaz B. H., Ocampo Arenas, M.L., Jiménez Ferrer J.E., Mora Escobedo R., Osorio Díaz P. (2020). Prebiotic effects of a mixture of agavins and green banana flour in a mouse model of obesity. *Journal of Functional Foods*, 64(10), 1-7. Doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103685

Ávila Reyes S.V., Camacho Díaz, B.H., Acosta García, M.C., Jiménez Aparicio, A.R., Hernández Sánchez H. (2016). Effect of salt and sugar osmotic stress on the viability and morphology of *Saccharomyces boulardii*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, 1(3), 593-602.

Bravo M.V., Bunout D., Leiva L., De la Maza M.P., Barrera G., De la Maza J., Hirsch S. (2008). Efecto del probiótico *Saccharomyces boulardii* en la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en adultos ambulatorios en tratamiento con amoxicilina. *Revista Médica de Chile*, 136(1), 981-988.

Buitrago Arias C. (2017). Estudio de un sistema acarreador constituido por fructanos y material lignocelulósico para el transporte de compuestos bioactivos. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional IPN, México.

Buts J.P. (2005). Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Revista Gastroenterol*, 25(1), 176-187.

Huazano García A., López M.G. (2015). Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones. *Food & Function*, 6(12), 3720-3727. <https://doi.org/10.1039/c5fo00830a>

Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO/OMS. (2011). Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>

Huazano García A., Shin H., López M.G. (2017). Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients*, 9 (821), 1-12. <https://doi.org/10.3390/nu9090821>

Mellado Mojica E., López M.G. (2012). Fructan Metabolism in A. tequilana Weber Blue Variety along Its Developmental Cycle in the Field. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(47), 11704-11713. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/jf303332n>

Miles A.A., Misra S.S., Irwin J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

Miramontes Corona C., Escalante A., Delgado E., Corona González R.I., Vázquez Torres H., Toriz G. (2020). Hydrophobic agave fructans for sustained drug delivery to the human colon. *Reactive and Functional Polymers*, 146(104396), 1-8. Doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104396

Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., & Santos, J. (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*, 134(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.019>

Rojas Ríos V.V. (2018). Encapsulación por gelación iónica de *Saccharomyces boulardii* con fructanos de *Agave angustifolia* Haw. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.

Velázquez-Martínez J.R., González-Cervantes R.M., Hernández-Gallegos M.A., Campos-Mendiola R., Jiménez-Aparicio A.R., Arenas-Ocampo M.L. (2014). Prebiotic Potential of *Agave angustifolia* Haw Fructans with Different Degrees of Polymerization. *Molecules*. 19, 12660-12675. Doi:10.3390/molecules190812660

Walz M., Hirth T., Weber A. (2018). Investigation of chemically modified inulin as encapsulation material for pharmaceutical substances by spray-drying. *Colloids and Surfaces A*, 536(1), 47–52.

Doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.072

Wu X.Y., Lee P.I. (2000). Preparation and Characterization of Inulin Ester Microspheres as Drug Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(1), 833–840.

Zamora Vega R. (2011). Elaboración de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional IPN, México.