

Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA”**; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Maura Téllez Téllez
Profesora Investigadora UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2021-09-23 20:06:29 | Firmante

gxOO/Z7MdxAMfDkXKLBA86KkUIR6yEYGLFxSoT39599U6JYYvOOOxMdfsSdqOqJpsrcGQ9gNswtCrIUymYcjwnzz9XaIWLk9O+W76IngL5VIBW+D/UeH6S8af6Aj7k+RMLfX/SxGm80XZWaWaE/yYFdVn9ci/Lhvh7luXhnq9HCtmEP0L8mk6lyer75c/FtAQDMGERBIWTBfLB8+6b8UMmvSW6v4Wo+lzWDk2aRXtsvcOfotPgS0jx2TiCPGsfRLsPWzk5Poh7Sr qosg9v2haoWSfKrThs2SnRnuNfRg3aM4o80hd9qM1Yc+kwNG6F2gTo0B6YMS7f0X5t7M/eq1w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



xVBfhZ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TLBQgnosVODHg3aUNvQbFdGezB1CHFon>





Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA”**; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Liliana Aguilar Marcelino
Profesora Investigadora

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2021-09-23 19:07:57 | Firmante

cVmQXMN9Uzgo9vRVlgULoFUFx9JvYIT6dSf65BdMUjqOqbk+NUvXFAhdZD0qRD4c5RC9VwTlk2XXOkRDI6FTV65G8mU7s57+wwLN7ABUaJzpxAOqNFp3H+F/RXludHJzW8
HUksMy0lBmZu879v26dLJQUihQnkoEPOBGBXOR8V36ho3mwUKYjLMsQKGYLab33IZtP8DY1HsilyL7N2fnJ4bgIHRCO4C1bKionTajyFEXiw9x1vi120V2tEGJ+CRhmdtT+5mSF
ixf8ihXPhSKCV7LbeqCWIErbkAJWlxuyFjW2y6fJr+oJ3YpR/PL8TZM32HYpbNvNrQHcqNoaaTMg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IvTxXg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3ogDGVh3Y62oaHHNNrn84VoVoCuARvZv>



Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA**”; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Alejandro García Flores
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRO GARCIA FLORES | Fecha:2021-09-23 18:43:51 | Firmante

VTec8uVcSoNnj4BDUqDYeiGE5JEWJBbD0zbDEYoVZGaif7Z6IPmCmIUkTi4jr0vicxT39t00H7Mu5OAOx1moKzO4fgMY3SKDHj1vBWYR0kdObUIVEuPCDxV1eaRNuATIjNjXurQUvKk3tj2BXugFfVMvpaW0dguuOjTmEKKb80UobWhB2J6vck8SuBP6hFXBzTmFRzz6gdJWBONqS6jtzYy7ADm0vLx2SY83OuR5GjvHbjOzzGAloJxflUiEsrl72pub8zfDgQmPD09n2UNKcSe8Z82qrzRbNvvWiNoM4Pi7UTNG6leTgTFeCZ1cfGwYw1sw60Xi855M7Np0xS+/Z3w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



82cFgE

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Ny2zIjYXfeWovyzyfPkYAbQLdskhx1J>



Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA”**; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Manases González Cortázar
Profesor Investigador

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2021-09-24 08:48:08 | Firmante

VOoKJPiLO8rky3hw8ZOZmT77KvUily9xNLfy7xeoK95k19l9nLSNXRRaMZUzkqjhc2+jPAM0Z2q8CoTzCUNilQt/kj6rpSjllfH0z0o2ztC4dpv2kvo5hIME/oBHHGHOIYnHS3mHyjHe072+0CbvdvB+gnI9qwGCIWLPZpkZRuxPIIYx5htZHvN+ep4BnDAUiv+A9TicmMivHvg3VM3Kn/lppIN7IK9GDCz8Mfn34VQRL9oRuz+mPEkVAfiK2tR/paVlKmVTmVWplGK5hvK1/KAlI399vs4mY56ukbp+pbX/8dcFs1+NNFbuGf72mfr57hUkxV3nxje5dYD/RRT+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



g4EGiT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PNjHoreFTDGkSBtUoHqngWnaOsinnZyF>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA”**; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Guadalupe Peña Chora
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha: 2021-09-23 19:47:25 | Firmante

1JdptY3hpHR5lmpHmtdj5YZjaiFHJ/N5Drir++D0EDvNj6DoKOKSB1neehU7maYASrB6k4e3uNWOLPyITVHoh7IIhNlvtY4acacIKSz6QAHQx3QfjjLCrzxNMC1K22p+Ue0LAJggoRBdZCJPF2C7G/OKeA44Tpdsl6jmjbvFAv8QVTTraJqIZpWdDXmO4d5kh2KWYr6IZOfRSituaA0nKJqDL3mnl30gOUBFRGcmRrdupBQs38b1mLOhde1+n5pArY8XuWG9iFUTensAVq02k5qNwSiCjsM+OUOa32TjpbYHHyRdb4b09nYzCBtZjt5seJqVXqccF9cwTzkKBSk7Xw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



QoXi4m

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FDHMPM032wXmW1lSykVmuL0bhLak0l4U>





Cuernavaca, Mor., a 17 de septiembre de 2021

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
UAEM

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD NEMATICIDA”**; que presenta la alumna **I.B.T. SUSAN YARACET PAEZ LEÓN**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta
Profesora Investigadora UAEM

C.c.p. archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,
Tel. (777) 329 70 29, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2021-09-23 19:48:38 | Firmante

Ajlw4T1/mL1kHu4rnJhGo920bbSmwTGqEBmN+7mtKZh/UIGayMT1jpgU+NSe6Up3vRkHdIlfo5cgkgfiPObzi2UlatwcSCY a5EOs/gYZAi+OomvFah0J2TjBj1QP1OgEtEyDX6aUm/OnkcWLiWp/GpHahknYUQaguuhLC9WIFctKN/cour7XrDACkePq+BKe9z1/Sm1JXK6anoONQsYqXCoKPTxyzXoYjAo53FUKaSEvzAq0fm8Z34HzbXOlz1fcYl0TK4n4iuxNT+V9tT5Hmw6dzah7DP8tz9ZdoqfpKWmBNBAPUKYABdsjMN7d/eb6etiMrwLp3a0Lli83TNjRQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zSNohF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MDJFGOX1ZA0mZJn3TfJ88NKUyhwCejhZ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS
EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL
HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD
NEMATÍCIDA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

IBT. SUSAN YARACET PÁEZ LEÓN

DIRECTOR

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

CODIRECTOR

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS
EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL SUSTRATO AGOTADO DEL
HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* CON ACTIVIDAD
NEMATÍCIDA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

IBT. SUSAN YARACET PÁEZ LEÓN

DIRECTOR

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

CODIRECTOR

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número **1005356** para la realización de los estudios de maestría y financiamiento de este proyecto y por el financiamiento del proyecto de Problemas Nacionales con el número 9342634372.

Al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por darme la oportunidad de realizar los estudios en la Maestría en Manejo de Recursos Naturales.

A la Dra. Maura Téllez Téllez mi directora de tesis gracias por brindarme su apoyo, confianza, consejos, su gran disposición y dirección para la realización del presente estudio.

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino mi codirectora de tesis, por su confianza, consejos, amistad, apoyo y por compartir sus conocimientos muchas gracias.

Al Dr. Manases González Cortázar por su asesoría, consejos y conocimientos otorgados a lo largo de la realización del presente proyecto.

Al Dr. Alejandro García Flores por su asesoría, conocimiento y aportaciones durante la realización del presente proyecto.

A mi comité revisor el Dr. Guadalupe Peña Chora y la Dra. Ma. De Lourdes Acosta Urdapilleta por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Gloria Sarahi Castañeda Ramírez y al M. en C. Antonio Pineda Alegría por su asesoramiento y apoyo durante la realización del presente proyecto.

DEDICATORIA

A Dios por otorgarme sabiduría, salud, perseverancia, bienestar y la capacidad de lograr lo que me proponga.

A mis padres Susana León Robles y Agustín Páez Barajas por todo su apoyo y amor incondicional en cada etapa de mi vida, por enseñarme a luchar por mis sueños y nunca rendirme sin haber dado lo mejor de mí. Los amo inmensamente.

A mis hermanas por ser esa pequeña motivación para seguir adelante y ser un ejemplo a seguir en el futuro, las amo.

A Miguel Gabriel Fernández Aguilar por su apoyo, consejos y estar presente en esta etapa de mi vida.

A mis abuelos por todo ese amor y apoyo que día con día me han brindado y nunca me han dejado sola.

A mi familia y amigos por todos esos momentos alegres compartidos, por las enseñanzas y consejos.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Enfermedades parasitarias	5
3.2. Nematodo <i>Haemonchus contortus</i>	6
3.3. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	6
3.4. Control químico de nematodos y resistencia antihelmíntica	8
3.5. Métodos alternos de control de nematodos parásitos	11
3.5.1 Rotación de potreros	11
3.5.2 Desparasitación selectiva (Técnica FAMACHA)	12
3.5.3. Control biológico	13
3.5.4. Etnoveterinaria.....	13
3.6 Hongos comestibles	15
3.6.1 Características generales de los hongos (setas)	16
3.6.2. Reproducción de los hongos comestibles	18
3.6.3. Hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	19
3.6.4 Valor nutricional y medicinal del hongo comestible <i>P. ostreatus</i>	21
3.7. Sustrato agotado de los hongos comestibles	22
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. OBJETIVOS.....	28
6. HIPÓTESIS	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
7.1. Localización	31
7.2. Material biológico.....	32
7.2.1. Obtención del sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	32
7.2.2 Obtención de huevos de <i>H. contortus</i>	32
7.2.3 Producción de larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	34
7.3. Obtención de extracto del sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	34

7.4. Fraccionamiento químico del material fúngico a través de cromatografía en columna abierta.....	36
7.5 Obtención de las reuniones	37
7.6 Bioensayos	38
7.6.1 Evaluación <i>in vitro</i> de fase acuosa (F. Ac.) y fase orgánica (F. AcOET) del sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	38
7.6.2 Prueba <i>in vitro</i> de las reuniones contra huevos y larvas de <i>H. contortus</i>	39
7.7. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas	40
7.8 Análisis estadístico	41
8. RESULTADOS	42
9. DISCUSIÓN	60
10. CONCLUSIÓN	64
11. PERSPECTIVAS	64
12. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Larva infectante sin vaina del nematodo <i>H. contortus</i> . Fuente: Propiedad de la autora del presente estudio.	6
Figura 2. Ciclo biológico del nematodo <i>H. contortus</i> . El ciclo comienza cuando el animal ingiere larvas L ₃ y estas pasan por el tracto digestivo llegando al abomaso, donde se adhieren a la mucosa y mudan a larvas L ₄ después a adultos donde se diferencian sexualmente. Las hembras copulan y depositan sus huevos los cuales son excretados al ambiente a través de las heces, después de 48 h eclosionan a larvas L ₁ y de 2-5 días mudan a larvas L ₂ y L ₃ y el ciclo comienza nuevamente. Fuente: Propiedad de la autora del presente estudio.....	8
Figura 3. Escala gráfica del método FAMCHA. Fuente: Vargas-Rodríguez, 2006.	12
Figura 4. Partes de un hongo del género <i>Pleurotus</i> spp. Fuente: Téllez- Téllez, 2018.	17
Figura 5. Reproducción de un hongo seta. Fuente: Propiedad de la autora del presente estudio.	19
Figura 6. Basidiomas del hongo comestible <i>P. ostreatus</i> . Fuente electrónica: https://www.fugleognatur.dk/gallery.asp?mode=ShowLarge&ID=753049	20

Figura 7. Instituciones involucradas en la presentes investigación. A) CIB-UAEM; B) CENID-SAI, INIFAP; C) Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR); D) CIBIS-IMSS.	31
Figura 8. Ovino donador macho localizado en campo experimental del CENID-SAI, INIFAP.	32
Figura 9. Lavado de huevo de <i>H. contortus</i> ; A) Tubo con solución de sacarosa 40% y muestra; B) Gradiente de concentración formado después de centrifugación.	33
Figura 10. Realización de coprocultivo para colecta de larvas L ₃ ; A) Palangana con muestra de heces; B) Muestras maceradas con hule espuma listas para incubación; C) Embudos de Baermann.	34
Figura 11. Proceso de obtención de fase acuosa; A) Sustrato agotado; B) Macerado de sustrato agotado en solución hidroalcohólica; C) Eliminación de metanol mediante una rota evaporadora.	35
Figura 12. Separación líquido-líquido; A) Fase acuosa; B) Recuperación de fase acuosa; C) Recuperación de fase orgánica de acetato de etilo.	35
Figura 13. Columna empacada con sílice gel fase normal y muestra adsorbida.	36
Figura 14. Placas cromatográficas de diferentes reuniones obtenidas de cromatografía capa fina.	38
Figura 15. Bioensayo de F.Ac. y F. AcOET en contra del nematodo <i>H. contortus</i> en placa de 96 pozos. Los cuadros verdes indican los controles utilizados y los cuadros rojos indican las fases a evaluar a diferentes concentraciones.	39
Figura 16. Diseño experimental de la evaluación de las 11 reuniones contra huevos y larvas de <i>H. contortus</i>	40
Figura 17. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunion R4 de F.AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i> . a) 1,2,3,4-tetrametoxibenceno; b) β -sitosterol; c) Estigmasterol; d) 5 α -stigmast-3,6-diona; e) Campesterol; f) Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona; g) 4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olido; h) Linoleato de metilo; i) Friedelan-3-ona; j) γ -Sitostenona; k) Spinasterona; l) 4 α -4-Metil stigmast-22-en-3-ona; m) γ -Palmito lactona; n) Palmitato de metilo	50
Figura 18. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R4 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	51

Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R5 de F.AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i> . a) <i>o</i> -Hidroxicinamato de metilo; b) <i>o</i> -Hidroxibenzaldehído; c) Vainillina; d) Apocinina; e) <i>o</i> -Hidroxi-acetofenona; f) Dimetil imidazolidinetriona; g) 2,4'-Metilenbis(fenol); h) Etosuximida; i) Linoleato de metilo; j) Coniferaldehído; k) 2,2-Dimetil-N-fenetilpropionamida; l) Bisfenol F; m) Butirovainillona; n) 2-Undecanona	53
Figura 20. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R5 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	54
Figura 21. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R6 de F.AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i> . a) <i>o</i> -Hidroxicinimato de metilo; b) <i>o</i> -Hidroxibenzaldehído; c) Vainillina; d) 4,5-Dimetol-2-propil-oxazol; e) Paeonol	55
Figura 22. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R6 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	56
Figura 23. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R7 de F.AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i> . a) <i>o</i> -hidroxicinamato de metilo; b) 4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído; c) Stigmasta-3,5-dien-7-ona; d) Escualeno; e) <i>o</i> -hidroxibenzaldehído; f) Vainillina; g) Ácido benzoico	58
Figura 24. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R7 de fracción F. AcOET de <i>P. ostreatus</i>	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales antihelmínticos usados para el tratamiento de nematodos gastrointestinales y su forma de uso.	9
Cuadro 2. Aplicaciones biotecnológicas del sustrato agotado de diferentes hongos comestibles.	23
Cuadro 3. Fracciones obtenidas de acuerdo al sistema de elución de cromatografía en columna abierta.....	37
Cuadro 4. Porcentajes de la inhibición de eclosión de huevo de <i>H. contortus</i> de F. AcOET y F. Ac. a diferentes concentraciones.	43
Cuadro 5. Datos de CL ₅₀ y CL ₉₀ de fracciones F. Acuosa y F. AcOET en el porcentaje de EHI	43

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad de larvas L ₃ de <i>H. contortus</i> por efecto de los tratamientos F. AcOET y F. Ac. a diferentes concentraciones.....	44
Cuadro 7. Datos de CL ₅₀ y CL ₉₀ de fracciones F. Acuosa y F. AcOET en el porcentaje de mortalidad de larvas L ₃	45
Cuadro 8. Reuniones obtenidas a partir de las fracciones colectadas y su peso final en mg.	45
Cuadro 9. Porcentajes de EHI y mortalidad por efecto de las reuniones de F. AcOET a 10 mg/mL.....	47
Cuadro 10. Composición química de R4 de fracción F. AcOET del sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	48
Cuadro 11. Composición química de R5 de fracción F. AcOET del sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	52
Cuadro 12. Composición química de R6 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de <i>P. ostreatus</i>	55
Cuadro 13. Composición química de R7 de fracción F. AcOET de <i>P. ostreatus</i>	57

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue realizar el fraccionamiento químico bio-dirigido del sustrato agotado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* y evaluar la actividad nematicida contra huevos y larvas de *Haemonchus contortus*, un nematodo de importancia pecuaria. El sustrato agotado de *P. ostreatus* fue extraído con una mezcla de metanol-agua (MetOH-H₂O; 70:30), que se concentró en un rotaevaporador hasta la disminución del volumen hasta un 75 % (eliminación total del metanol) dando un extracto hidroalcohólico, al que posteriormente se le agregó Acetato de etilo (AcOET) para una extracción líquido-líquido, en donde se obtuvieron dos fases; una fase acuosa (F. Ac) y una fase de acetato de etilo (F. AcOET). Ambas fracciones (F. Ac y F. AcOET) se evaluaron contra huevos y larvas infectantes L₃ de *H. contortus* para obtener la fracción con efecto ovicida y/o larvicida y de acuerdo a estos resultados proceder a realizar la separación química por las diferentes técnicas de cromatografía. El diseño experimental ovicida y larvicida se realizó en placas de 96 pozos, con MetOH 2%, PBS y tiabendazol (TBZ) 5 mg/mL como controles y cinco concentraciones diferentes como tratamientos (5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/mL). Las lecturas fueron realizadas 24 h y 72 h postconfrontación en un microscopio óptico (4x y 10x). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA a través de un diseño completamente al azar en el programa SAS (V9). Las fracciones de F. AcOET y F. Ac mostraron un efecto ovicida a 5 mg/mL contra *H. contortus* de 78.80% y 76.89% respectivamente. En cuanto al porcentaje de mortalidad de larvas (L₃) la fase F. AcOET obtuvo el mayor porcentaje siendo 60.91% y F. Acuosa obtuvo un 29.77% ambos a una concentración de 5 mg/mL. Se realizó el

fraccionamiento químico de la fase con mayor actividad nematicida (F. AcOET), obteniendo 11 reuniones las cuales fueron evaluadas contra huevos y larvas de *H. contortus* a una concentración de 10 mg/mL. Los resultados de estas evaluaciones mostraron que las reuniones R4, R5, R6 y R7 fueron las que presentaron actividad nematicida mayor al 90%. Posteriormente se hizo un análisis por cromatografía gases-masas para determinar que compuestos estaban presentes, se identificaron los siguientes compuestos: 1) vainillina, 2) β -sitosterol, 3) *o*-hidroxicinamato de metilo, 4) *o*-hidroxibenzaldehído como compuestos mayoritarios principalmente.

2. INTRODUCCIÓN

Una de las principales limitantes para el desarrollo de la ganadería son las infecciones por parásitos gastrointestinales, de acuerdo con el estudio realizado por Rodríguez-Vivaz *et al.* (2017) sobre la evaluación de las pérdidas económicas de los parásitos en bovinos en México, se estima que las pérdidas anuales por parásitos son de \$865,400 millones de pesos en el país, dando como consecuencia una baja producción económica en el área pecuaria.

Los ovinos se consideran como una especie susceptible a la infestación múltiple de nematodos gastrointestinales (NGI), los cuales pueden causar severas pérdidas en ganaderías basadas en sistemas de pastoreo (Beltrão-Molento *et al.*, 2011). Entre los nematodos gastrointestinales que afectan a los pequeños rumiantes, la prevalencia más alta es: *Cooperia* sp., *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta*, *Trichostrongylus* sp., *Oesophagostomum* sp. y *Haemonchus contortus*; este último es el nematodo más patógeno con mayor mortalidad y morbilidad, provocando problemas de anorexia, diarrea, pérdida de peso, anemia, edemas e incluso la muerte (Cala *et al.*, 2012; Zapata *et al.*, 2016).

El principal método empleado por los ganaderos para el control, tratamiento y prevención de NGI en rumiantes ha sido el uso de antihelmínticos (lactonas macrocíclicas, benzimidazoles e imidazotiazoles); sin embargo, su uso indiscriminado ha generado la resistencia del parásito a estos grupos de compuestos, el primer caso de resistencia antihelmíntica fue notificado por primera vez en 1964 (Carvalho *et al.*, 2012). Además, provocan un daño ambiental en mantos freáticos y en organismos benéficos como los escarabajos estercoleros (*Scarabaeus laticollis*), dípteros coprófagos y lombrices del suelo (Fernández *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2014).

La resistencia antihelmíntica es la capacidad que tiene una fracción de una población para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de la misma especie (Suárez, 2001), por lo que se han implementado estrategias de control

alternativo como el uso de partículas de óxido de cobre, control biológico, uso de plantas medicinales y hongos comestibles.

El cultivo de hongos comestibles constituye un sistema de producción y consumo, que ha adquirido una importancia importante en el mundo y en México, constituye los aspectos sociales, económicos, ecológicos, farmacéuticos, terapéuticos y de salud funcional-nutricional (Garibay-Origel, 2018). La producción de hongos es más eficiente debido al hecho de que puede ser producida directamente en materiales de desechos lignocelulósicos (paja, aserrín, bagazo, residuos de café, cáscara de semilla de algodón, etc.) (Nieto y Chegwin, 2010).

La fungicultura realizada sobre desechos genera tanto desarrollo económico a diferentes niveles como beneficios ecológicos. La facilidad de desarrollo de los hongos en esta clase de sustratos ha dado vía libre a procesos biotecnológicos basados en la bioconversión llevada a cabo por ellos, y que se ha denominado la revolución no verde (Nieto y Chegwin, 2010).

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* poseen actividad nematocida y cestocida (Aguilar-Marcelino, 2017; Velasco-Cruz, 2017), produciendo una toxina (ostreanina) capaz de inmovilizar al nematodo, provocando su muerte. Además de producir enzimas, proteínas, péptidos y metabolitos secundarios tóxicos para los nematodos (Li y Zhang, 2014). Un estudio realizado por Rodríguez-Barrera, (2021) evaluó el extracto hidroalcohólico de 10 mezclas de sustrato agotado de *P. ostreatus* contra huevos y larvas infectantes L₃ del nematodo *H. contortus* en donde obtuvo como resultados que la mezcla AT5 fue la que presentó un porcentaje de mortalidad de 79.69 y un 98.24% de inhibición de eclosión de huevo, por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad nematocida que tienen las fracciones químicas obtenidas del extracto hidroalcohólico de la mezcla AT5 del sustrato agotado del hongo comestible *P. ostreatus* en contra de huevos y larvas (L₃) del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*.

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedades parasitarias

Las enfermedades parasitarias o parasitismo son un tipo de asociación biológica entre organismos de diferentes especies, en la que uno de ellos (el parásito) obtiene beneficio de esta relación y vive a expensas del otro (hospedador o huésped), causándole daño (Olalla y Tercero, 2011).

La parasitosis gastrointestinal de los rumiantes es una enfermedad producida por una variedad de nematodos parásitos que se alojan en el tracto digestivo y que afecta normalmente a los animales jóvenes, generando lesiones y trastornos funcionales que impactan el desarrollo adecuado de los animales e incluso puede provocar la muerte de estos (González-Garduño *et al.*, 2011).

La infección por NGI es de las parasitosis más comunes en México, afectando principalmente a los ovinos, los cuales son animales que se adaptan bien a varios ambientes adversos, con diferentes climas y sistemas de explotación (Espinal *et al.*, 2006); sin embargo, estos presentan baja producción, siendo, además, susceptibles a la infección mixta de parásitos gastrointestinales como helmintos (nematodos, trematodos, cestodos) (Benavidez, 2009).

Con el paso de los años se han llevado a cabo investigaciones donde se han encontrado los efectos producidos por los NGI en los ovinos y que están directamente relacionados a la pérdida de peso, reproducción y producción de carne. Gracias a estos conocimientos los especialistas en esta área pueden generar y utilizar herramientas para el control sustentable de estas parasitosis en distintas zonas (Soca *et al.*, 2005).

3.2. Nematodo *Haemonchus contortus*

El nematodo hematófago de mayor importancia es *H. contortus* (**Figura 1**), el cual se localiza en el abomaso e intestino delgado de los rumiantes y es capaz de succionar 0.05 mL de sangre al día, por lo cual, una cantidad de 5,000 larvas extraerían 250 mL de sangre diarios (Abbott *et al.*, 2012). Se caracteriza por provocar un síndrome de mala digestión y anemia, la enfermedad se presenta con mayor intensidad en animales jóvenes. La infección se realiza por la ingestión de pasto con larvas infectantes, causando pérdidas considerables en las ganaderías ovinas de países templados, tropicales y subtropicales.



Figura 1. Larva infectante sin vaina del nematodo *H. contortus*. **Fuente:** Propiedad de la autora del presente estudio.

3.3. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo y consta de dos fases, los animales parasitados excretan junto con las heces huevos prácticamente indiferenciables, de forma ovoide e incoloros. Su tamaño oscila entre 70-100 μm de longitud por 40-60 μm de ancho.

La fase exógena comienza con la expulsión de los huevos en las heces fecales del animal al exterior y si las condiciones de humedad (80%) y temperatura (20°) son óptimas este eclosiona en 48 h para dar origen a larvas de primer estadio L_1 , las que a su vez pasan a ser larvas del segundo estadio (L_2); en este proceso se desprenden de su cutícula

protectora. Las larvas L₂ sufren una segunda muda para transformarse en larva tres (L₃) o estadio infectante (Soca *et al.*, 2005).

Tanto la L₁ como la L₂ se alimentan de las bacterias presentes en las heces fecales; sin embargo, la L₃, que se encuentra cubierta por la cutícula desprendida de la L₂, no puede alimentarse y depende de sus reservas alimenticias para su supervivencia, por tal motivo emigran a la hierba donde permanecen hasta ser ingeridas por un hospedador (Campillo del Cordero y Rojo-Vásquez, 2001). El tiempo requerido para que los huevos se transformen en larvas infectantes, cuando las condiciones ambientales son favorables, se estima alrededor de siete a diez días.

La fase endógena se inicia con la ingestión de la L₃ y termina con el desarrollo de los parásitos, la cópula y la producción de huevos. Una vez dentro del sistema digestivo, con el incremento del pH que ocurre en el rumen, la larva infectante (L₃) muda mediante la secreción de la enzima leusinoaminopeptidasa producida por sus células neurosecretoras. Las larvas L₃ penetran la membrana mucosa o entran en las glándulas gástricas, donde se transforman en L₄. Aquí permanecen entre 10 y 14 días, y su desarrollo puede inhibirse temporalmente por condiciones fisiológicas adversas. Posteriormente las L₄ dejan la mucosa y se alojan en el lumen abomasal para transformarse en larvas L₅ y después en parásitos adultos, hembras y machos (Vázquez, 2000; Soca *et al.*, 2005). Tras la copula las hembras inician la producción de huevos y de esta manera, se cierra el ciclo (**Figura 2**).

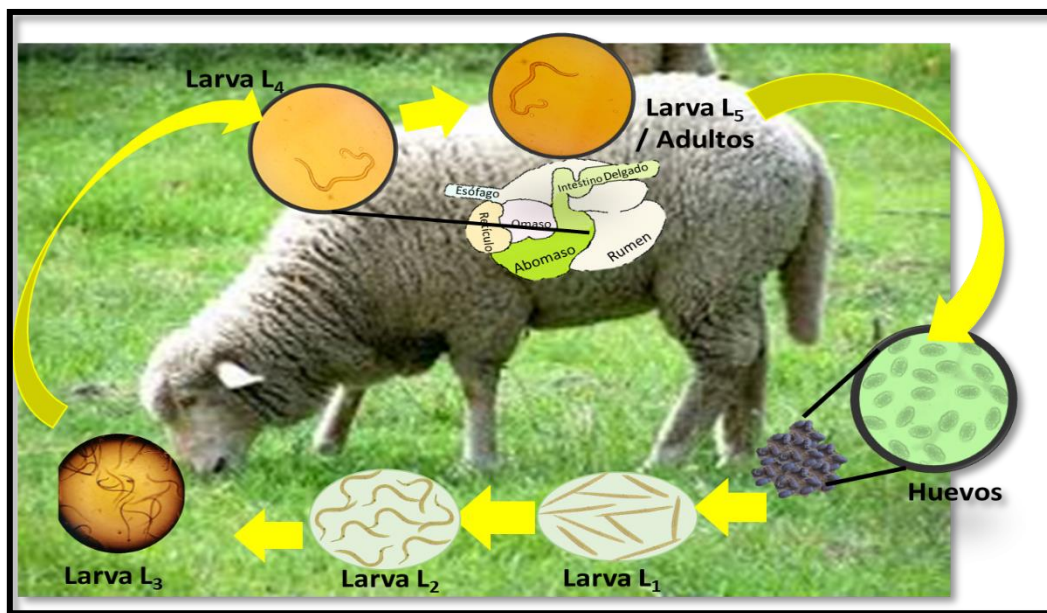


Figura 2. Ciclo biológico del nematodo *H. contortus*. El ciclo comienza cuando el animal ingiere larvas L₃ y estas pasan por el tracto digestivo llegando al abomaso, donde se adhieren a la mucosa y mudan a larvas L₄ después a adultos donde se diferencian sexualmente. Las hembras copulan y depositan sus huevos los cuales son excretados al ambiente a través de las heces, después de 48 h eclosionan a larvas L₁ y de 2-5 días mudan a larvas L₂ y L₃ y el ciclo comienza nuevamente. **Fuente:** Propiedad de la autora del presente estudio.

3.4. Control químico de nematodos y resistencia antihelmíntica

El método de control más conocido y utilizado contra los NGI, es sin duda el químico, basado en el uso de fármacos con actividad antihelmíntica que aplicados a las dosis recomendadas (CL₅₀ y CL₉₀) son letales para los parásitos y ejercen mínimos o nulos efectos sobre el huésped (**Cuadro 1**). Este tipo de fármacos se caracteriza por su alta eficacia, aunque también depende la susceptibilidad del nematodo al que se le aplique el fármaco (Becerra-Nava *et al.*, 2014).

Los antihelmínticos disponibles en la actualidad se agrupan de acuerdo con su naturaleza química y sus efectos sobre los parásitos en benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas, siendo los más utilizados para el tratamiento de la nematodiasis (Olazarán-Jenkins *et al.*, 2019).

El uso y abuso indiscriminado de los antihelmínticos ha generado que los NGI se vuelvan resistentes hacia estos. La resistencia antihelmíntica (RA) es la capacidad que tiene una fracción de una población para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de la misma especie, la resistencia no debe ser confundida con tolerancia, que se refiere a la falta de respuesta innata de la población parasitaria para cada droga, independientemente de la exposición previa (Suárez, 2001).

Cuadro 1. Principales antihelmínticos usados para el tratamiento de nematodos gastrointestinales y su forma de uso.

Espectro	Grupo químico	Principio activo	Vía de administración	Mecanismo de acción
Amplio	Benzimidazoles	Albendazol, thiabendazol, oxfendazol, sulfoxido de albendazol	Oral, subcutánea	Fijadores de tubulina
	Imidazotiazoles	Levamisol	Subcutánea	Bloqueadores ganglionares
	Lactonas macrocíclicas	Ivermectina, abamectina, doramectina	Oral, subcutánea	Potenciadores GABA
Medio	Organofosforados	Triclorfón, naftalophos	Subcutánea	Antagonistas de acetilcolinesterasa
Espectro reducido	Salicilanidas	Closantel, nitroxinil	Oral, subcutánea	Desacopladores de la fosforilación oxidativa

La resistencia antihelmíntica se presenta de diversas formas:

- Resistencia múltiple: esta se presenta cuando los parásitos son resistentes a más de dos grupos de antihelmínticos diferentes (Márquez-Lara, 2003).
- Resistencia cruzada: se presenta cuando se involucran sustancias químicas de modo de acción diferentes (Márquez-Lara, 2003).
- Resistencia paralela: a diferencia de las anteriores se da cuando los parásitos de una población resistente a una sustancia química son también resistentes a otro producto que tiene similar mecanismo de acción (Márquez-Lara, 2003).

Los diferentes factores que determinan la resistencia se pueden clasificar en: 1) factores externos que dependen del mecanismo de acción de los antihelmínticos, el grado de eficacia, frecuencia de los tratamientos, dosis, rotaciones, y forma de manejo de los animales e internos y 2) factores internos que dependen específicamente de los NGI como las características genéticas (heredabilidad, dominancia, nivel de resistencia, y habilidad biológica relativa) además de características biológicas (potencial biológico (reproductivo), intervalo entre generaciones, estadio expuesto a la droga, y la proporción de la población en refugio (Torres-Vásquez *et al.*, 2007).

Por otro lado, el uso de fármacos antihelmínticos en el ganado, causa un daño al ambiente a través de su excreción directa en las heces, orina y la eliminación inadecuada de frascos vacíos, afectando a organismos benéficos que habitan en las heces y suelo que juegan un papel fundamental en el reciclaje del nitrógeno en la naturaleza (Benyon, 2012), dentro de estos organismos, se encuentran los insectos coprófagos, en particular los coleópteros, dípteros coprófagos y lombrices, ecosistema de pastizal y factores edáficos. Entre los dípteros se encuentran las moscas que se encargan de la descomposición de animales muertos, también encontramos a insectos que polinizan los cuales son intoxicados por residuos de ivermectina encontrados en los pastos y ríos por causa de las heces y la orina (Aparicio-Medina *et al.*, 2012).

La lombriz de tierra se alimenta de tierra, enriquece el suelo porque fija nutrientes y oxígeno, así desempeña un papel importante en la ecología del suelo. El ecosistema de pastizal depende del reciclaje de la materia orgánica producida y de la cantidad de elementos disponibles que se encuentran en las heces fecales, éstas están compuestas por elementos orgánicos ya transformados, si no se da la degradación se inmoviliza la materia orgánica y los elementos minerales, la estructura del suelo no se modifica para retener el agua necesaria para la vegetación. Los principales factores edáficos que se ven afectados son la composición química del suelo por la muerte de los insectos coprófagos, ya que se disminuye el nitrógeno necesario para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Aparicio-Medina *et al.*, 2012).

De igual manera pueden permanecer como residuos tóxicos contaminantes en la carne, leche y subproductos animales para el consumo humano, poniendo en riesgo la salud pública de los consumidores (Beyene, 2016).

3.5. Métodos alternos de control de nematodos parásitos

La aparición y extensión de poblaciones parasitarias en diversas especies resistentes a los antihelmínticos, la creciente preocupación por la inocuidad alimentaria y el impacto negativo sobre el ambiente son las principales razones que impulsaron la búsqueda de métodos alternativos al uso de fármacos sintéticos en el control de NGI en pequeños rumiantes (Sepúlveda-Vázquez *et al.*, 2018) dentro de estos métodos alternativos se encuentran la rotación de potreros, desparasitación selectiva, control biológico, uso de plantas medicinales y de hongos comestibles.

3.5.1 Rotación de potreros

Consiste en limitar el tiempo de permanencia del ganado de un área dada de pastoreo a otra área, con la finalidad de que las áreas pastoreadas queden temporalmente en un descanso, sin permitir el acceso a los animales. De esta manera, en las áreas en descanso

si el pasto contiene larvas infectantes activas en las gotas del rocío, no serán consumidas por los animales, durante cierto periodo, de manera que las larvas van perdiendo viabilidad e inclusive la población de larvas disponibles en estas áreas disminuyen significativamente, ya que estas van muriendo al agotar sus reservas energéticas o bien por otros factores como el incremento de temperatura que puede causar desecación y muerte por deshidratación, la radiación solar y la presencia de enemigos naturales quienes también contribuyen a disminuir la población larvaria en el pasto. Así una vez que los animales se ingresan nuevamente a esta área después del descanso estarán mucho menos expuestos a ingerir larvas infectantes de los parásitos junto con el pasto (Kumar *et al.*, 2013).

3.5.2 Desparasitación selectiva (Técnica FAMACHA)

Esta técnica consiste en evaluar la coloración de la conjuntiva del ojo de los animales y compararlo con una tabla ilustrada (**Figura 3**) que muestra las tonalidades correlacionadas con la condición anémica del animal (Vargas-Rodríguez, 2006).

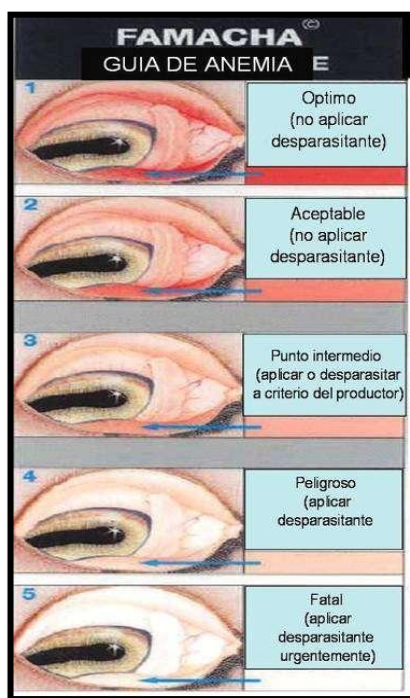


Figura 3.Escala gráfica del método FAMACHA. **Fuente:** Vargas-Rodríguez, 2006.

La tabla tiene una escala de cinco categorías, donde uno y dos corresponden a la tonalidad más oscura y define al animal como más saludable, por lo que no requiere dosificación de desparasitante; el tres es definido como punto intermedio, la decisión de aplicar el fármaco depende del usuario; las categorías cuatro y cinco definen un grado de anemia riesgoso, en esta etapa la aplicación de fármaco es inevitable y debe realizarse lo antes posible (Coffey, 2012)

3.5.3. Control biológico

Es un método de control de parásitos que consiste en utilizar organismos antagonistas de otro organismo con objeto de controlar las poblaciones estos. Es una medida reguladora de los nematodos parásitos de ganado, llevando las cargas parasitarias a un nivel no perjudicial para los ovinos, en donde el ser humano a estructurado programas para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel aceptable a diferencia de los programas de control químico, que su principal objetivo es eliminar todo nematodo dentro del organismo (Mendoza de Gives y Valero Coss, 2009; Aguilar-Marcelino, 2012).

Entre los antagonistas naturales de los nematodos se encuentran: bacterias, hongos nematófagos, nematodos depredadores de otros nematodos, ácaros (Aguilar-Marcelino, 2012). Las características que debe cumplir un organismo de control biológico deben ser: virulencia hacia el nematodo, especificidad, capacidad de crecer, facilidad de reproducción, bajo costo y conservar la inocuidad de animales, humanos y hacia el ambiente (Verdejo, 2005).

3.5.4. Etnoveterinaria

En el control de parásitos se han utilizado diversas plantas que contienen sustancias bioquímicas con efecto antihelmíntico. Los principales compuestos de estas plantas son los terpenos, los alcaloides, las saponinas, las antraquinonas y los taninos; estos han sido usados por las comunidades indígenas de América Latina en la herbolaria tradicional,

como una práctica milenaria, y actualmente se evalúan en diversos estudios a nivel mundial con un concepto etnobotánico (Alonso-Díaz *et al.*, 2009).

La obtención de extractos de plantas utilizando solventes orgánicos han mostrado resultados interesantes con diversas plantas en contra de nematodos de importancia en la producción pecuaria (Worku *et al.*, 2017). En este sentido, Hernández y López, (2000) estudiaron el efecto antihelmíntico de los extractos de las siguientes plantas medicinales: estafiate (*Artemisia ludoviciana*), epazote (*Dysphania ambrosioides*), semilla de calabaza (*Cucurbita* sp.), semilla de papaya (*Carica papaya*) y ajo (*Allium sativum*), y encontraron una acción antiparasitaria variable y con una eficacia de moderada a baja.

De igual forma, Martínez, (2010) evaluó el efecto de plantas ricas en taninos (*Lysiloma latisiliquum*, *Onobrychis viciifolia* y *Chinopsis* sp.), y sus resultados sugieren que los compuestos del follaje de dichas plantas pueden intervenir en funciones vitales de los NGI como la movilidad, la nutrición y, posiblemente, la reproducción; pero en ambos casos el efecto antihelmíntico es reducido si se compara con el de los productos antihelmínticos comerciales.

Por otro lado, González- Cortázar *et al.* (2018) identificaron un metabolito contra los NGI a partir de extractos de hojas de Tepehuaje (*Lysiloma acapulcensis*), evaluando un extracto acuoso y dos fracciones orgánicas y acuosas, contra huevos de *H. contortus*, demostrando así que *L. acapulcensis* tiene presencia de micricitina como compuesto principal, el cual tiene actividad antihelmíntica.

De igual manera, Páez-León, (2018) evaluó un extracto de acetato de etilo de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) contra huevos y larvas infectantes del nematodo *H. contortus*, demostrando que las hojas de *M. oleifera* presentan un 95.83% de inhibición de eclosión de huevo y un 68.19% de mortalidad contra larvas L₃, por lo que presenta compuestos nematocidas.

3.6 Hongos comestibles

Los hongos han sido utilizados por la sociedad desde tiempos antiguos; los griegos consideraban que daban fuerza a los guerreros, los faraones los apreciaban por su delicadeza; los romanos los veían como el “alimento de los dioses” y los servían sólo en ocasiones especiales; los chinos les denominaban “el elíxir de la vida” por ser considerados un alimento saludable. Por su parte, los indígenas mexicanos, los utilizaban como alucinógenos en fiestas religiosas, así como para propósitos terapéuticos (Gaitán-Hernández, 2015).

La producción mundial de hongos comestibles cultivados ha aumentado más de 30 veces desde 1978; para 2012 se registraron más de 31 millones de ton, generando 20,000 millones de dólares, con un consumo per cápita de hongos que supera los 4.70 kg anuales (Chang y Wasser, 2012); en 2017 se registró que en el año 1994 se tenía una producción mundial de 2,677,000 ton y en el año 2017 incrementó a 10,242,541 ton **(Gráfico 1)** (FAO, 2017).

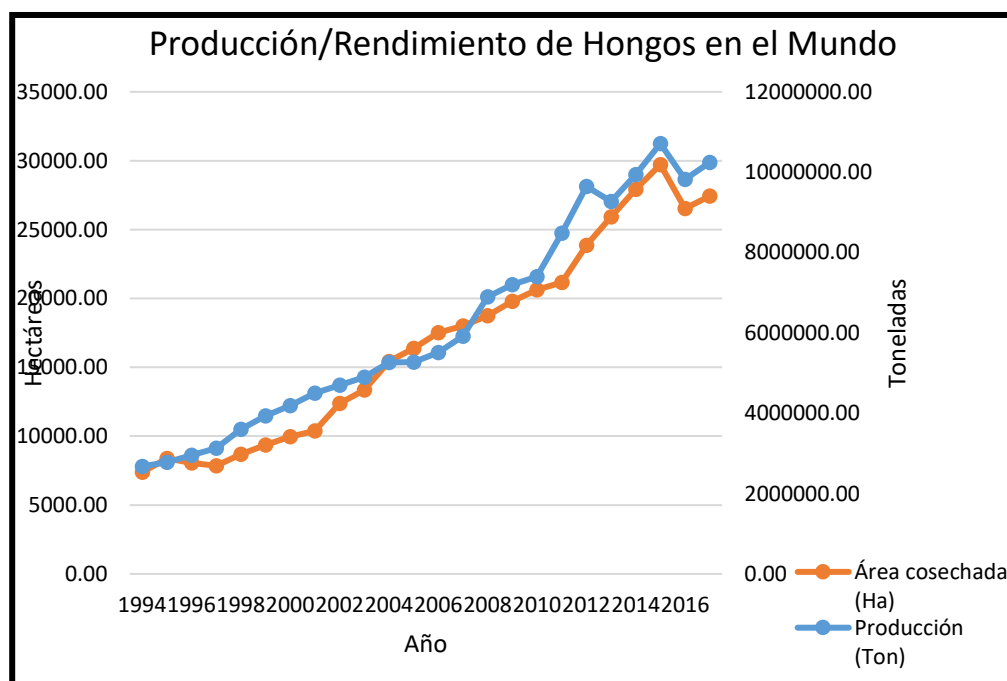


Gráfico 1. Producción y rendimiento de hongos a través de los años en el mundo (FAO, 2017).

Royse y Sánchez, (2017) mencionan que cinco géneros principales comprenden cerca de 85% de la oferta mundial de hongos, *Lentinula edodes* (shiitake) es ahora el más ampliamente cultivado, con 22% de la producción mundial seguido de *Pleurotus* spp., y *Auricularia* spp., que cuentan con 19% y 18% respectivamente, *Agaricus bisporus* ocupa el cuarto lugar en términos de producción mundial con 15% del total, *Flammulina* con un 11% de producción y *Volvariella* con un 5%.

México es el mayor productor de Latinoamérica, generando alrededor de 81 % de la producción total de la región, seguido por Brasil (8 %), Colombia (5%), Chile (4%) y Argentina (2%), ubicándose como el 13° a nivel mundial (Romero-Arenas *et al.*, 2015).

Cabe resaltar que para el año 2011 se tuvo una producción de hongos frescos de 62,374 ton, aumentando cada año (Martínez-Carrera *et al.*, 2012). Además, la producción de setas (*Pleurotus* spp.) en México se ha incrementado en los últimos 10 años; actualmente corresponde a una proporción de 4.76 % de la producción total (Martínez-Carrera *et al.*, 2016).

En todo el mundo los hongos son considerados nutritivos y medicinales debido a su sabor, textura y riqueza en proteínas, minerales y vitaminas. Se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macromicetos, como sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, o inmunomoduladoras (Suárez-Arango y Nieto, 2013).

3.6.1 Características generales de los hongos (setas)

Las setas son hongos que se desarrollan principalmente sobre troncos en descomposición u otros sustratos vegetales. Cada hongo está formado por una serie de finos filamentos llamados hifas, que en conjunto forman lo que se denomina micelio. En la naturaleza y bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, este micelio extendido sobre un sustrato adecuado, se transforma en pequeños grumos que van aumentando de tamaño

hasta formar la típica seta. El hongo formado con su sombrero y su pie, tiene la función de producir las estructuras de reproducción llamadas esporas cuya misión es perpetuar la especie. Estas esporas se forman en la cara inferior del sombrero, en unas laminillas verticales que se extienden desde la parte superior del pie hasta el borde del sombrero. Un hongo o cuerpo fructífero representa para el micelio lo que un fruto para un árbol (Figura 4).

Las setas se alimentan de la materia orgánica en la que están creciendo, degradando las sustancias con enzimas que liberan al medio húmedo que les rodea, por ello es importante el suministrar un sustrato adecuado al hongo cuando se le intente cultivar para que los nutrientes puedan ser aprovechados por las hifas del micelio (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

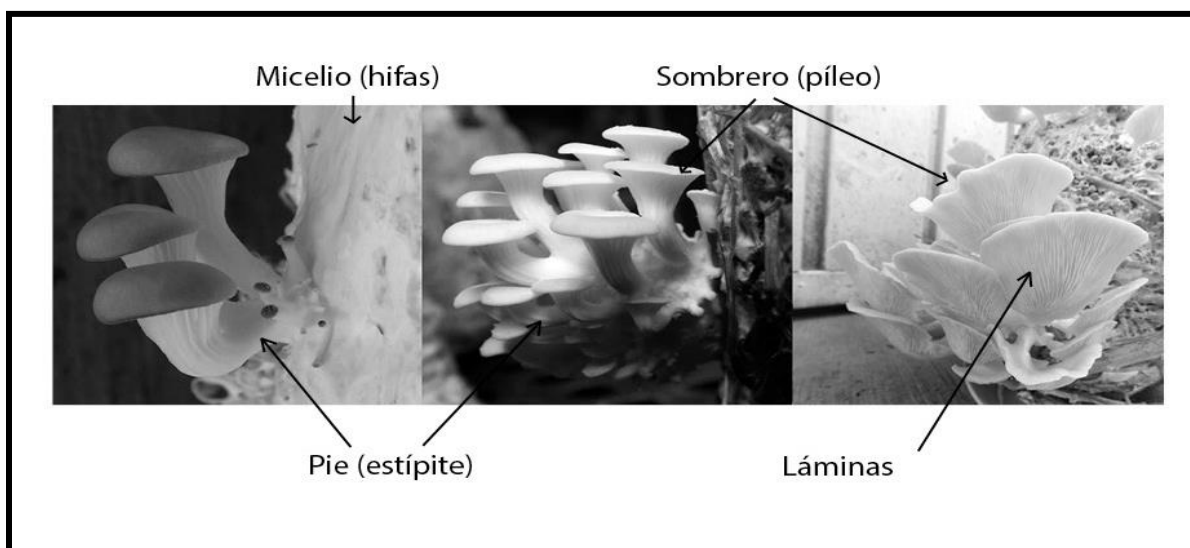


Figura 4. Partes de un hongo del género *Pleurotus* spp. **Fuente:** Téllez- Téllez, 2018.

3.6.2. Reproducción de los hongos comestibles

En el caso de los hongos hay dos formas para dar origen a nuevos individuos: la sexual y la asexual. A esta última también se le conoce como somática o vegetativa, debido a que no involucra fusión de núcleos. Se puede dar por fragmentación del micelio, el cual, al colocarse bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y sustrato, da origen a un nuevo individuo.

Los hongos superiores poseen células localizadas en el himenio que son las encargadas de producir las esporas. Cuando las esporas maduran se desprenden del basidio, que se encuentra en la parte inferior del sombrero, y con ayuda del viento "flotan" en el aire hasta que caen por su propio peso. Si la spora se deposita en un lugar cuyas condiciones sean favorables dará origen al micelio. Este crecerá bajo el suelo o entre la hojarasca, se ramificará y se entremezclará con los micelios de otras esporas para dar origen al micelio secundario, el cual crecerá y se diferenciará hasta formar los cuerpos fructíferos. Para que el cuerpo fructífero se desarrolle es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto del contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes de cada uno de los compartimentos que se fusionaron. Es a partir de estos, que, por divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos y su posterior migración, hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra se forma el micelio dicarion (Sánchez y Royse, 2001).

El micelio heterocarion es capaz de crecer vigorosamente y de multiplicarse vegetativamente en esta condición de forma indefinida (**Figura 5**). Esto ha permitido mantener las características de alta producción, color y excelente calidad culinaria, de muchas de las cepas de hongos comestibles que en la actualidad se cultivan comercialmente en diferentes partes del mundo. Por tanto, éste es el tipo de micelio que muchas casas comerciales y laboratorios venden a los cultivadores de hongos

comestibles, quienes al inocularlo sobre el substrato lo multiplican (Sánchez y Royse, 2001).

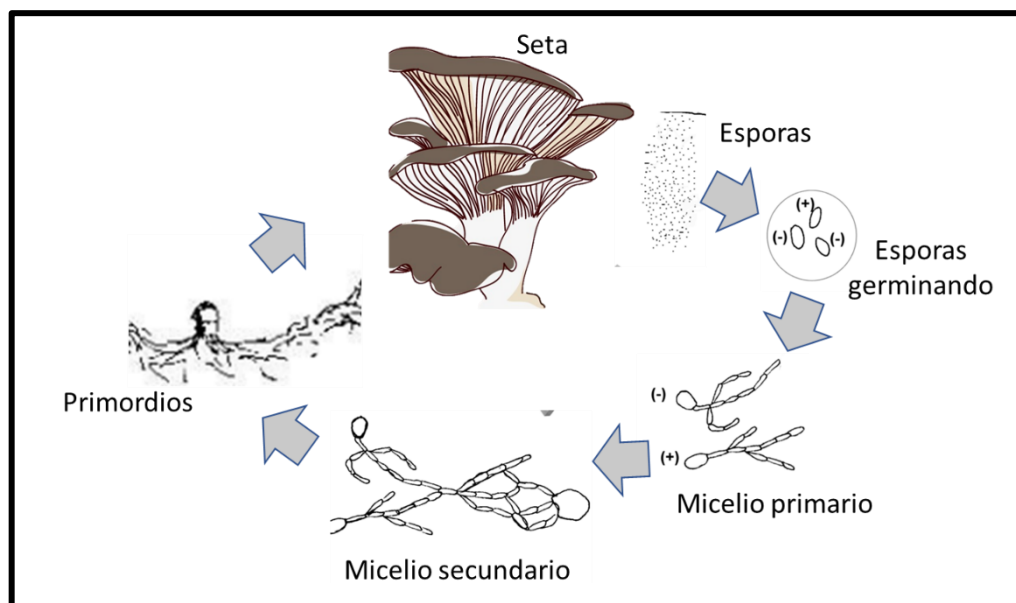


Figura 5. Reproducción de un hongo seta. **Fuente:** Propiedad de la autora del presente estudio.

3.6.3. Hongo comestible *Pleurotus ostreatus*

Los hongos del género *Pleurotus* son cosmopolitas y se caracterizan por poseer un alto valor nutrimental, potencial nutraceutico y varias aplicaciones biotecnológicas (Cohen *et al.*, 2002; Asaduzzaman Khan y Mousumi, 2012).

De acuerdo con Royse *et al.* (2017) los hongos *Pleurotus* spp. es uno de los grupos más importantes de hongos comestibles cultivados comercialmente, se estima una producción de 6.46×10^9 kg, en Latinoamérica la producción comercial se genera en Brasil, México, Colombia, Argentina y Guatemala.

En México se cultivan principalmente las especies *P. pulmonaris*, *P. ostreatus* y *P. djamor* debido a que crecen en las condiciones climáticas templadas y cálidas son óptimas (Gaitán-Hernández y Salmenes, 2008; Royse y Sánchez, 2017). La mayoría de las especies

de *Pleurotus* poseen actividad contra nematodos, se han realizado estudios en varios hongos pertenecientes a este género como *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii* y *P. cornucopiae* en donde se demuestra dicha actividad (Heydari *et al.*, 2006; Okorie *et al.*, 2011, Cuevas-Padilla, 2018; Comans-Pérez *et al.*, 2021).

El hongo *P. ostreatus* es un hongo comestible (**Figura 6**) cuya fuente de alimento es la materia orgánica constituida de compuestos lignocelulósicos, es decir que se alimenta de lignina, celulosa y hemicelulosa que son azúcares encontrados principalmente en paja, maíz, caña, trigo, cebada y demás residuos que tengan estas características (Miranda, 2013).

Es una especie común, que crece en grandes grupos con individuos superpuestos entre sí, sobre la superficie de troncos de árboles que están muriendo y restos de maderas de árboles, como el sauce blanco (*Salix alba*), la haya común (*Fagus sylvatica*), el álamo o chopo (*Populus alba*). Solo tiene forma de vida saprofítica y no actúa como parásito. A medida que el árbol va decayendo y muriendo por otras causas, *P. ostreatus* se desarrolla sobre la masa de madera muerta que va en aumento.



Figura 6. Basidiomas del hongo comestible *P. ostreatus*. **Fuente electrónica:** <https://www.fugleognatur.dk/gallery.asp?mode=ShowLarge&ID=753049>

Además de sus características nutricionales y gastronómicas, este hongo posee propiedades benéficas para el organismo entre las que destacan la estimulación del sistema inmunológico, reducción del colesterol y niveles de glucosa, además de la disminución de la probabilidad de tumores y cáncer (Álvarez-Gutiérrez *et al.*, 2016).

3.6.4 Valor nutricional y medicinal del hongo comestible *P. ostreatus*

El uso de hongos en la dieta de los seres humanos ha prevalecido debido a su sabor y olor característico. Presentan una composición química que los hace atractivos desde el punto de vista nutricional; en general, contienen 90 % de agua y 10 % de materia seca, de los cuales 27-48 % son de proteína, aproximadamente 60 % corresponde a carbohidratos, en especial fibras dietéticas (D-glucanas, quitina y sustancias pépticas) y 2-8 % son lípidos, entre los cuales destaca el ácido linoleico. El alto contenido proteico, (15 al 35% del peso seco), refleja las creencias que los hongos son un sustituto efectivo de la carne, aunque no todos los hongos silvestres contienen gran cantidad de proteínas, su valor nutritivo puede ser comparado con el de muchas especies vegetales. El contenido de minerales en los hongos comestibles varía entre 6 y 11 % según la especie; los que aparecen en mayor cantidad son el calcio, potasio, fósforo, magnesio, zinc y cobre. En cuanto al contenido de vitaminas, los hongos comestibles son ricos en riboflavina (B2), niacina (B3) y folatos (B9).

Se ha demostrado que los hongos cuentan con diferentes propiedades nutricionales, funcionales y medicinales tales como la propiedad antitumoral, antiviral, antidiabético, anti parasítica, antibacteriana, anti hipertensión, hepatoprotectora, anti arterioesclerosis, inmunomoduladora y nematocida (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020).

3.7. Sustrato agotado de los hongos comestibles

Los residuos obtenidos durante la actividad agrícola ocasionan un impacto ambiental negativo cuando son arrojados a fuentes naturales de agua o almacenados en lugares cercanos a la población. Los daños ocasionados dependerán de las características fisicoquímicas de los materiales; por ejemplo, si el residuo en cuestión es rico en carbohidratos, se tiene el riesgo de que la microflora presente inicie un proceso de degradación y en consecuencia ocasione la presencia de lixiviados, los cuales se filtrarían a través de las diferentes capas del suelo hasta llegar a los mantos acuíferos. Por otra parte, si los microorganismos presentes son bacterias anaerobias, se tendría como producto de dicha degradación, la generación de malos olores (Saval, 2012).

Una forma de realizar la transformación de estos residuos para su aprovechamiento, es mediante el cultivo de hongos comestibles y medicinales tropicales, debido a la composición química de estos y de otros en el sector agrícola que se generan en nuestro país, como los residuos de la producción de la caña de azúcar, el arroz y el algodón, entre otros.

La producción comercial de *Pleurotus* spp. se ha desarrollado gracias a que su cultivo es relativamente fácil y se adapta a una gran cantidad de sustratos de muy diversa composición. Los sustratos para su cultivo están generalmente constituidos con materiales de desecho abundantes en el sector agrícola que obtienen un valor importante al ser utilizados en el cultivo de estos hongos. La especie que se cultiva a mayor escala es, sin duda, *P. ostreatus*, la cual se valora por su capacidad de producción de alimento de buena calidad y por su alta versatilidad para adaptarse a muy diferentes tipos de residuos agrícolas y agroindustriales (Royse y Sánchez, 2017).

El sustrato agotado (por sus siglas en inglés SMS) se genera una vez que cesa la producción de cuerpos fructíferos en el cultivo de macromicetos, esto sucede una vez que el sustrato en el que fue inoculado el micelio no cuenta con más nutrientes

disponibles para la absorción y nutrición del hongo (Rinker, 2017). Por lo tanto, las investigaciones han perseguido el reciclaje de SMS como materia prima.

En *Pleurotus* spp. el sustrato agotado ha sido evaluado como un material de alimentación con investigación que incluye: alimento de ganado/rumiantes, composta de bagazo de caña de azúcar en una mezcla dietética para rumiantes, y estudios de degradación / ensilado, sin embargo, el sustrato agotado de diferentes hongos tiene diferentes aplicaciones biotecnológicas (Rinker, 2017) **(Cuadro 2)**.

Cuadro 2.Aplicaciones biotecnológicas del sustrato agotado de diferentes hongos comestibles.

Hongos comestibles	Insumos utilizados	Aplicación biotecnológica
<i>Agaricus bisporus</i>	Paja, heno, semillas de algodón, hojarasca.	Degradación de fibras como celulosa, hemicelulosa y lignina
<i>Agaricus bisporus</i>	Paja, heno, semillas de algodón, hojarasca.	Biorremediación de tintas textiles
<i>Pleurotus</i> spp.	Paja, semillas, trigo.	Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, petróleo y remediación de suelos mineros contaminados
<i>Lentinula edodes</i>	Paja, semillas de algodón	Eliminación/degradación de pentaclorofenol
<i>Agaricus bisporus</i>	Paja	Degradación de azoxistrobina

<i>Pleurotus</i> spp.	Paja de avena, trigo, hojarasca	Degradación de varios pesticidas
<i>Lentinula edodes</i>	Heno, paja	Degradación de metalaxil, benalaxil, penconazol, tebuconazol, pirimetanil, ciprodinil, iprovalicarb, y azoxystrobin y chlorothalonil e imidaclopridlinuron
<i>Agaricus subrufescens</i>	Paja, heno, semillas de algodón, hojarasca.	Producción de plántulas de lechuga
<i>Lentinula edodes</i>	Heno, paja	Producción de plantas de semillero de Lechuga
<i>Pleurotus</i> spp.	Paja de avena, trigo, hojarasca	Cultivo de lechuga, tomate, calabacín, pimiento, pepino, maíz y pimiento.
<i>Flammulina velutipes</i>	Paja, heno, semillas de algodón, hojarasca.	Producción de miel semillas de melón de rocío
<i>Pleurotus</i> spp.	Paja de avena, trigo, hojarasca	Biofertilizante
<i>Pleurotus</i> spp.	Paja de avena, trigo, hojarasca	Alimento de ganado/rumiantes, compost de bagazo de caña de azúcar en una mezcla dietética para rumiantes, pollos, Alces, cabras, corderos y ovejas

En un estudio realizado por Marques-Ferreira *et al.* (2019) evaluaron el potencial nematocida de *Flammulina velutipes* y su sustrato agotado (SMS). Adicionalmente, analizaron la actividad nematocida de enzimas y metabolitos. El aislado *F. velutipes* y su sustrato agotado tuvieron un efecto nematocida significativo en larvas de *Panagrellus* sp. Los porcentajes de reducción en relación con el grupo control fueron: 69, 57.5 y 70% para SMS y 56, 24.5 y 26.6% para el hongo aislado, durante 24, 48 y 72 h, respectivamente.

Las especies del género *Pleurotus* sp. cuya producción y consumo están en aumento, además de tener cualidades nutritivas y medicinales, pueden utilizar como sustrato para su cultivo una variedad mayor de materiales que otros hongos (aproximadamente 200 desechos diferentes), debido a su rápido crecimiento micelial, a las demandas nutricionales simples necesarias para su desarrollo, que deben ser proporcionadas por el sustrato, y a su sistema de enzimas multilaterales, que le permiten biodegradar casi todos los tipos de residuos disponibles (Nieto y Chegwin, 2010).

RESERVA DE SECRECÍA DE PATENTE

La presente investigación deriva de un proyecto cuyos resultados se someterán a registro de patente por tal motivo los detalles experimentales de la presente tesis han sido planteados bajo reserva de secrecía.

4. JUSTIFICACIÓN

El problema de resistencia antihelmíntica se ha vuelto más grave, por lo que se buscan alternativas de control sustentables para combatir los NGI. Los hongos comestibles producen compuestos bioactivos que poseen gran importancia en la biotecnología, industria química y farmacéutica. De igual forma han sido estudiados para buscar nuevas moléculas y compuestos con múltiples actividades medicinales/terapéuticas (antiparasitaria) y poseen una importante actividad biológica contra nematodos parásitos de animales. Los hongos del género *Pleurotus* tienen un gran impacto ya que se encargan de reciclar la materia orgánica en el medio ambiente, también ha sido importante en la agricultura y la alimentación, además utilizan como sustrato una variedad de materiales que presentan distintas propiedades, generando así, una cantidad de residuos agroindustriales, por lo que se busca otorgarles un uso a estos residuos. Con la realización del presente estudio se espera generar información importante sobre la actividad nematicida de productos naturales obtenidos a partir de fracciones químicas del sustrato agotado del hongo *P. ostreatus* con un uso potencial contra NGI de ovinos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar el fraccionamiento químico bio-dirigido de extractos orgánicos del sustrato agotado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* y evaluarlos contra el nematodo *Haemonchus contortus*.

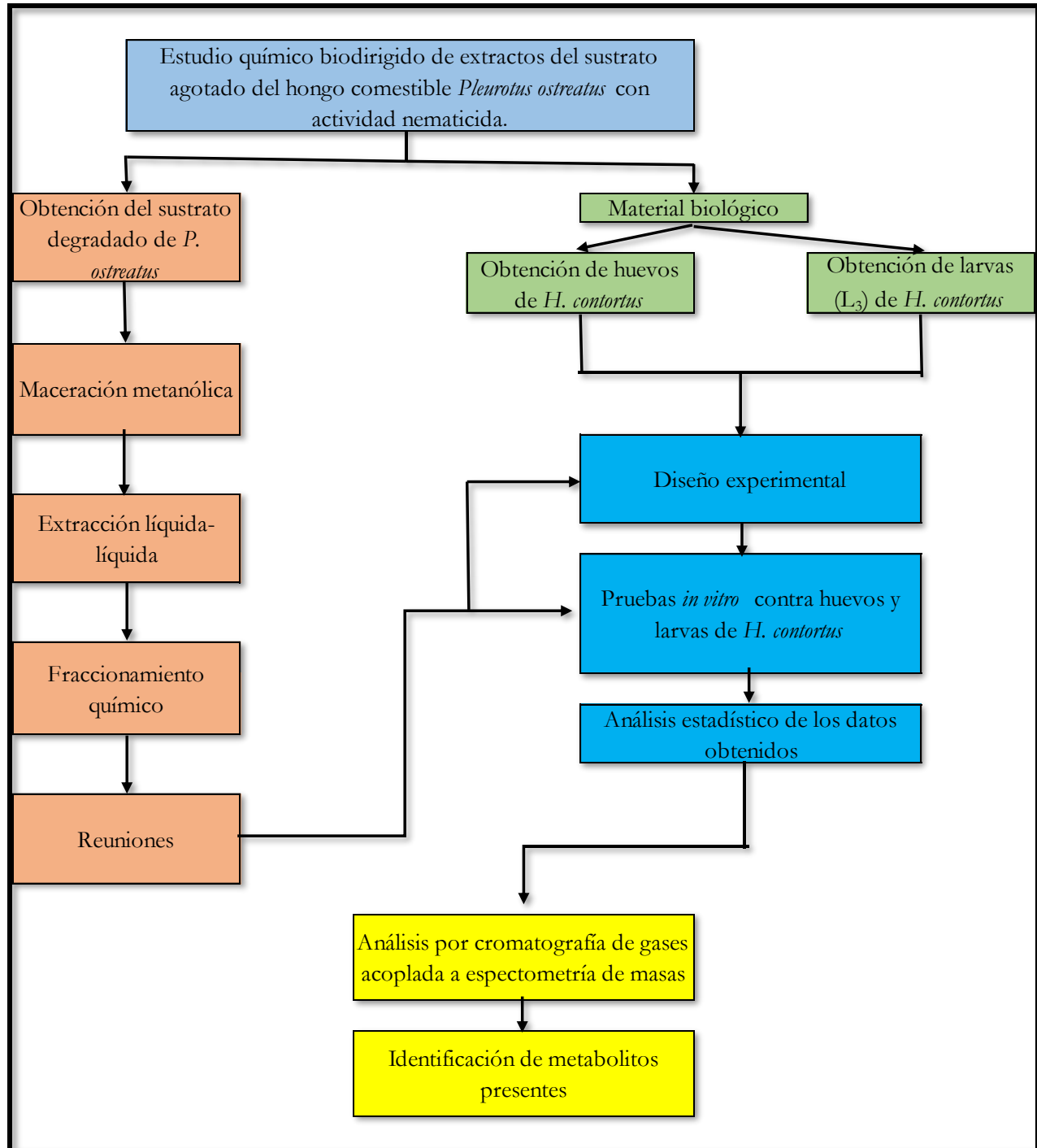
Objetivos específicos

1. Fraccionar químicamente y de manera bio-dirigida los extractos orgánicos del sustrato agotado del hongo comestible *P. ostreatus* en los dos modelos biológicos.
2. Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de diferentes fracciones químicas del sustrato agotado del hongo comestible *P. ostreatus* contra huevos y larvas (L₃) del nematodo *H. contortus*.
3. Identificar los metabolitos presentes en las fracciones químicas con el mejor efecto biológico obtenidas del sustrato agotado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

6. HIPÓTESIS

Al menos una de las fracciones químicas del sustrato agotado del hongo *P. ostreatus* presentará un efecto nematicida significativamente en la inhibición de la eclosión de huevos o efecto letal contra larvas infectantes (L₃) del nematodo *H. contortus*

7. MATERIAL Y MÉTODOS



7.1. Localización

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM en Cuernavaca, Morelos, México y en el Departamento de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-SAI) del INIFAP, localizado Jiutepec, Morelos. El sustrato agotado fue producido en el Laboratorio de Hongos Tropicales de El Colegio de la Frontera Sur (Ecosur), en el estado de Chiapas, México y el fraccionamiento químico se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) en Xochitepec, Morelos, México (**Figura 7**).



Figura 7. Instituciones involucradas en la presentes investigación. A) CIB-UAEM; B) CENID-SAI, INIFAP; C) Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR); D) CIBIS-IMSS.

7.2. Material biológico

7.2.1. Obtención del sustrato agotado de *P. ostreatus*

El sustrato agotado se obtuvo del cultivo del lote AT5 de la cepa ECS-1123 de *P. ostreatus* del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) sede Tapachula, Chiapas, el cual presenta una composición del 33.33% de olote, pasto y pulpa de café.

7.2.2 Obtención de huevos de *H. contortus*

Para la obtención de huevos se utilizó un ovino donador macho raza Pelibuey de 3 meses de edad con un peso entre 20-25 kg libre de parásitos (**Figura 8**) el cual fue infectado artificialmente con 350 larvas infecciosas de *H. contortus* (L₃) por kilogramo de peso. Después de un período de 21 días post-infección se recolectaron muestras fecales directamente del recto del animal para realizar un conteo de HPG (número de huevos por gramo de heces) mediante la técnica de McMaster para confirmar que la infección fue positiva (Torres-Acosta *et al.*, 2015).



Figura 8. Ovino donador macho localizado en campo experimental del CENID-SAI, INIFAP.

Una vez confirmada la infección, se recolectaron nuevas muestras fecales, las cuales fueron maceradas y tamizadas a través de un sistema de mallas de diferentes aperturas: 35, 100, 200 y 400 utilizando agua (Liébano *et al.*, 2011).

Posteriormente el líquido resultante se recolectó y se lavó con una solución de sacarosa al 40% en una relación 3:1, se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 min, con el fin de formar un gradiente de densidad (**Figura 9**) recuperando así los huevos que quedan en el anillo que se forma. Posterior a esto los huevos fueron sometidos a 3-5 lavados con agua destilada los cuales se centrifugaron por 5 min a 3,500 rpm para eliminar la mayor cantidad de sacarosa y residuos fecales (Pineda-Alegría, 2016; Cuevas-Padilla, 2019).



Figura 9. Lavado de huevo de *H. contortus*; A) Tubo con solución de sacarosa 40% y muestra; B) Gradiente de concentración formado después de centrifugación.

7.2.3 Producción de larvas infectantes de *H. contortus*.

A los 21 días después de la infección del ovino donador se recolectaron las heces en donde están almacenados los huevos con ayuda de una palangana y se realizaron coprocultivos, los cuales fueron incubados durante siete días a temperatura ambiente. Pasado el periodo de incubación se recuperaron las larvas por medio de la técnica del embudo de Baermann (**Figura 10**) (Figueroa- Castillo *et al.*, 2015).

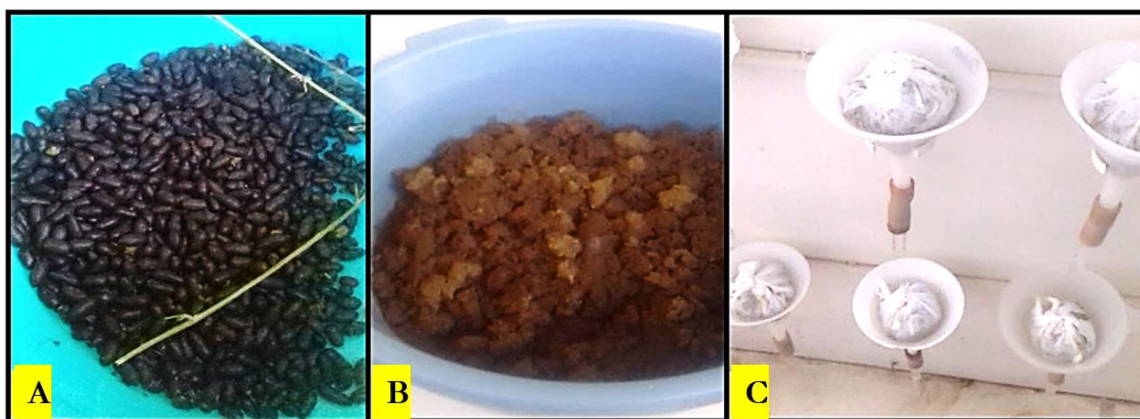


Figura 10. Realización de coprocultivo para colecta de larvas L₃; A) Palangana con muestra de heces; B) Muestras maceradas con hule espuma listas para incubación; C) Embudos de Baermann.

Las larvas (L₃) se desenvainaron utilizando hipoclorito de sodio 0.187% en donde las larvas fueron expuestas durante 5 min, posteriormente se centrifugaron durante 1.5 min a 3500 rpm por triplicado con el fin de eliminar residuos de hipoclorito de sodio (Pineda-Alegría, 2016).

7.3. Obtención de extracto del sustrato agotado de *P. ostreatus*.

El sustrato agotado seco se colocó en un matraz de 5 gal, el cual contenía una solución hidroalcohólica en una relación 30-70% agua-metanol, se dejó en reposo durante una

hora y se filtró utilizando un embudo y gasas. El filtrado se concentró utilizando un rotaevaporador con el fin de eliminar todo el metanol y dejar solo la fracción acuosa (Figura 11).

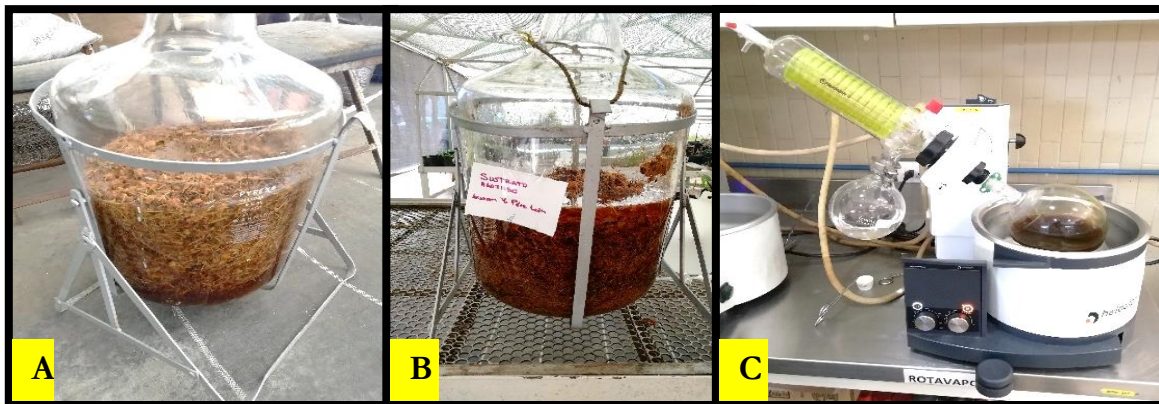


Figura 11. Proceso de obtención de fase acuosa; A) Sustrato agotado; B) Macerado de sustrato agotado en solución hidroalcohólica; C) Eliminación de metanol mediante una rota evaporadora.

Posteriormente se realizó una extracción líquido-líquida (bipartición) donde en un embudo de separación se colocó Acetato de etilo (AcOET) y la fracción acuosa recuperada anteriormente, la mezcla se homogenizó y se dejó en reposo 15 min. Pasado el tiempo se recuperaron la fase orgánica (F. AcOET) y fase acuosa (F. Ac) (Figura 12), las cuales se concentraron en una rota evaporador y se secaron al alto vacío utilizando un liofilizador.

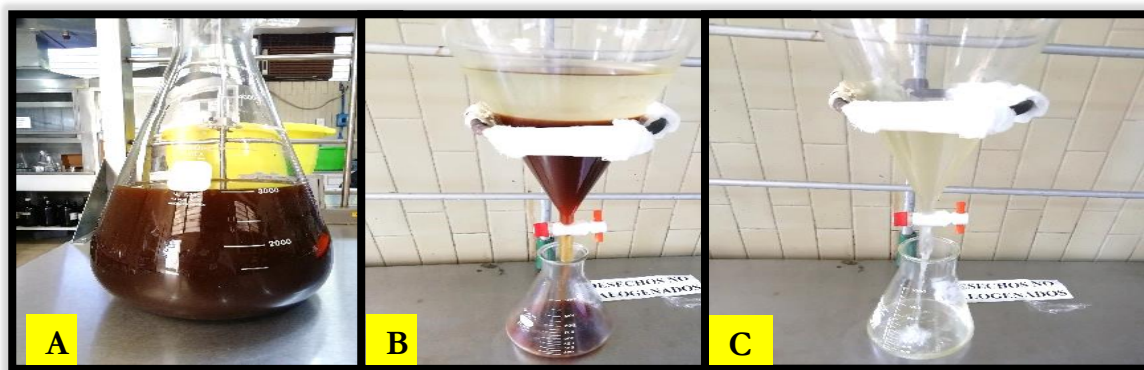


Figura 12. Separación líquido-líquido; A) Fase acuosa; B) Recuperación de fase acuosa; C) Recuperación de fase orgánica de acetato de etilo.

7.4. Fraccionamiento químico del material fúngico a través de cromatografía en columna abierta.

El fraccionamiento químico se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta (Cruz-Arévalo, 2017; Pineda-Alegría, 2017). Se disolvió 1 g de F. AcOET con acetona y se mezcló con 2 g de sílice gel fase normal, se homogenizó hasta su adsorción completa. Para el empaquetamiento de la columna de vidrio (7 x 40 cm) se utilizaron 15 g de sílice gel fase normal y su estabilización se hizo con hexano y cambios de polaridad (5%) con acetato de etilo como eluyentes y volúmenes de colecta de 15 mL, para dar 76 fracciones (**Figura 13: Cuadro 3**).



Figura 13.Columna empacada con sílice gel fase normal y muestra adsorbida.

Cuadro 3. Fracciones obtenidas de acuerdo al sistema de elución de cromatografía en columna abierta

Sistema de elución	Fracción colectada
100% Hexano	1-5
95:5, Hex: AcOET	6-11
90:10, Hex: AcOET	12-17
85:15, Hex: AcOET	18-23
80:20, Hex: AcOET	24-29
75:25, Hex: AcOET	30-35
70:30, Hex: AcOET	36-42
65:35, Hex: AcOET	43-48
60:40, Hex: AcOET	49-55
55:45, Hex: AcOET	56-61
50:50, Hex: AcOET	62-67
30-70, Hex: AcOET	68-75
100% Acetato de etilo	76

7.5 Obtención de las reuniones

Cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) (**Figura 14**). Las fracciones que mostraron compuestos parecidos, con base en el factor de retención y los solventes utilizados, fueron reunidas y concentradas en un rotaevaporador y se secaron a alto vacío en una liofilizadora. Finalmente, las fracciones fueron almacenadas a -4°C hasta su evaluación (Pineda- Alegría, 2017).



Figura 14. Placas cromatográficas de diferentes reuniones obtenidas de cromatografía capa fina.

7.6 Bioensayos

7.6.1 Evaluación *in vitro* de fase acuosa (F. Ac.) y fase orgánica (F. AcOET) del sustrato agotado de *P. ostreatus*.

Para la evaluación de la actividad nematicida de las fases F. AcOET y F. Ac. en contra de huevos y larvas del nematodo *H. contortus*, se utilizaron placas de 96 pozos (**Figura 15**). Por cada pozo se colocaron 50 μ L de la fase a evaluar aplicando cinco concentraciones; 5, 2.5, 1.25, 0.6125 y 0.3125 mg/mL para cada fase y 50 μ L de suspensión acuosa de huevos o larvas de *H. contortus*, obteniendo un volumen final de 100 μ L y 100 huevos/larvas por pozo. Se incluyeron como controles negativos PBS pH 7.4 y Metanol 2%, y un control positivo de un antihelmíntico comercial (Tiabendazol 5 mg/mL). Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones. Se cubrieron las placas con

papel aluminio y se incubaron a 28 ± 1 °C durante 48 h para huevos y 72h para larvas. Posteriormente se realizó la lectura post-confrontación en un microscopio óptico (4x y 10x).

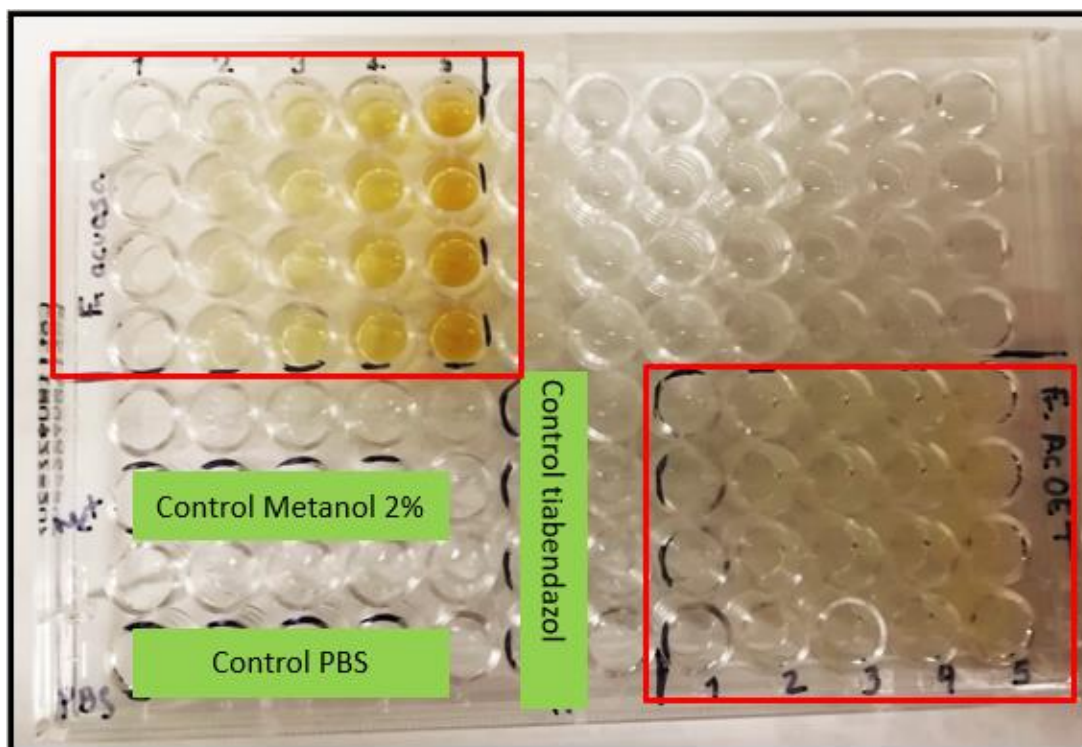


Figura 15. Bioensayo de F.Ac. y F. AcOET en contra del nematodo *H. contortus* en placa de 96 pozos. Los cuadros verdes indican los controles utilizados y los cuadros rojos indican las fases a evaluar a diferentes concentraciones.

7.6.2 Prueba *in vitro* de las reuniones contra huevos y larvas de *H. contortus*

En esta prueba se utilizó una placa de 96 pozos., donde cada pozo contenía 50 μ L de las reuniones a evaluar a una concentración de 10 mg/mL y 50 μ L de suspensión acuosa de huevos o larvas. Se incluyeron un control negativo (metanol 2%) y un control positivo (tiabendazol 5mg/mL), se realizaron 3 repeticiones y la placa fue cubierta con papel aluminio e incubada a 28 ± 1 °C durante 48h y 72 h (**Figura 16**). Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura post- confrontación en un microscopio óptico (4x y 10x).

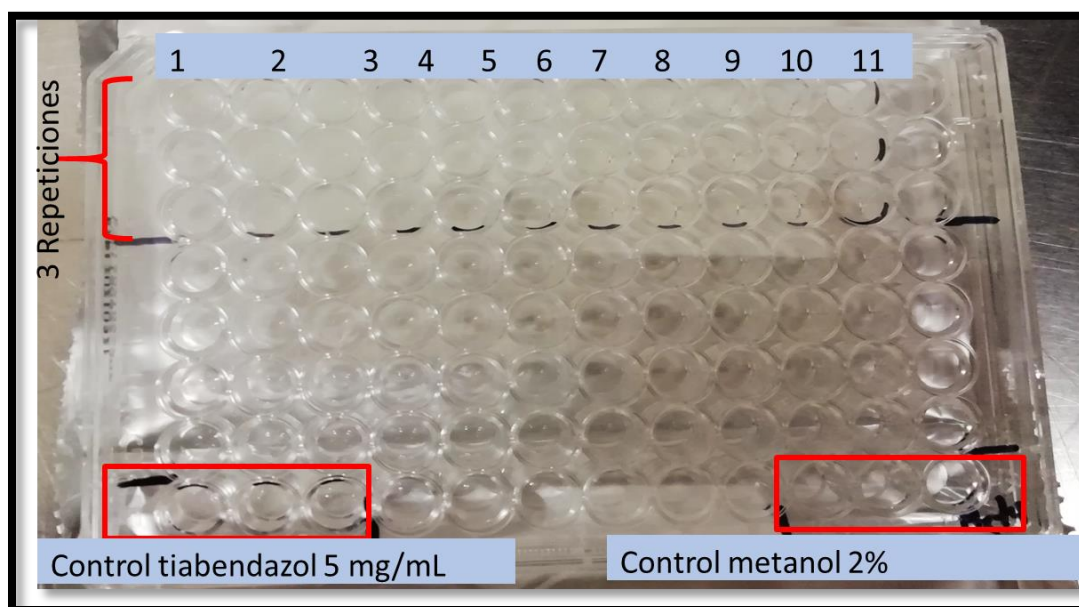


Figura 16. Diseño experimental de la evaluación de las 11 reuniones contra huevos y larvas de *H. contortus*

7.7. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas

Las reuniones que mostraron una actividad nematicida mayor ya sea contra huevos o larvas fueron seleccionadas para ser analizadas por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). Las muestras fueron disueltas en una mezcla de hexano: acetato de etilo (1:1) y posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 7890B-5977A-MSD. El análisis de la muestra se realizó bajo las condiciones: volumen de inyección 1.0 μ L, modo Split 75:1, utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1.0 mL/min y una columna HP-5MS 5% fenilo metilsiloxano (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m).

El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial 50°C, rampa 8°C/min y una temperatura final de 300°C por 10 min. La temperatura del inyector fue de 300°C, la temperatura de la línea de transferencia fue de 310°C y finalmente una energía de ionización de 70 eV.

La identificación de los componentes se llevó a cabo por comparación computarizada con la base de datos de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST) versión 14.0.

7.8 Análisis estadístico

El porcentaje de inhibición de eclosión (IEH) y mortalidad de larvas fue calculado mediante la siguiente formula

$$\% \text{ IEH} = \frac{\text{Número de huevos no eclosionados} * 100}{\text{Número total de huevos (larvas y huevos)}}$$

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Número de larvas muertas} * 100}{\text{Número total de larvas (vivas y muertas)}}$$

El porcentaje de EHI o mortalidad se ajustó de acuerdo a lo establecido por Scheneider-Orelli's (1947) con la siguiente fórmula

$$\% \text{ IEH o mortalidad} = \frac{x \text{ grupo tratado} - x \text{ control negativo}}{100 - x \text{ control negativo}} * 100$$

Los porcentajes de mortalidad e IEH fueron transformados a raíz cuadrada y posteriormente arcoseno para homogenizar la varianza y obtener una aproximación a la distribución normal. El análisis de varianza se llevó a cabo utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 2009 y adicional a esto se realizó la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia de 0.05 y se calculó la CL₅₀ Y CL₉₀.

8. RESULTADOS

En el Cuadro 4 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición de eclosión de huevo (EHI) contra F. Ac. y F. AcOET, donde se puede observar que el mayor porcentaje lo presentó F. AcOET con 78.80% a 5 mg/mL y el menor porcentaje fue de 37.34% a 0.3125 mg/mL y se puede observar un efecto dependiente de la concentración.

En el caso de F. Ac. los resultados muestran que a 5 mg/mL se obtuvo un 76.89% y a 0.3125 mg/mL se tuvo un 9.95%, sin embargo, a una concentración de 0.625 mg/mL el porcentaje disminuyó a 1.91% y al subir la concentración el porcentaje aumentó. Esto se debe al ajuste de la modificación de la fórmula de mortalidad.

Los datos del cálculo de CL_{50} y CL_{90} se muestran en el Cuadro 5 donde se observa que el mejor valor lo presentó F. AcOET con una CL_{50} de 0.6 mg/mL y una CL_{90} 10.8 mg/mL a comparación de F. Ac que obtuvo una CL_{50} de 1.75 mg/mL y una CL_{90} 5.49 mg/mL.

Cuadro 4. Porcentajes de la inhibición de eclosión de huevo de *H. contortus* de F. AcOET y F. Ac. a diferentes concentraciones.

Concentración	% Inhibición de la eclosión de huevo			
	F. AcOET		F. Ac.	
	Promedio +DE	%Ajustado	Promedio +DE	%Ajustado
MetOH 2%	14.96± 3.59	0 ^e	-	-
PBS	-	-	13.03± 5.84	0 ^d
TBZ 5 mg/mL	100± 0.00	100 ^a	100± 0.00	100 ^a
0.3125 mg/mL	46.71± 6.05	37.34 ^d	4.38± 2.51	9.95 ^{cd}
0.625 mg/mL	48.35± 5.46	39.26 ^d	14.69± 1.77	1.91 ^d
1.25 mg/mL	51.43± 4.32	42.88 ^{cd}	27.45 ± 9.26	16.58 ^c
2.5 mg/mL	61.48± 6.75	54.70 ^c	66.10± 7.80	61.02 ^b
5 mg/mL	81.98±4. 34	78.80 ^b	79.90 ± 5.68	76.89 ^b
CV	7.03			12.09
R ²	0.97			0.97

Letras iguales en la misma columna indican que los valores no difieren estadísticamente según prueba de Tukey (p=0.05); n=4 (cuatro pozos).

Cuadro 5. Datos de CL₅₀ y CL₉₀ de fracciones F. Acuosa y F. AcOET en el porcentaje de EHI

Tratamiento	Inhibición de eclosión de huevo (%)			
	CL ₅₀	IC Limites 95%	CL ₉₀	IC Limites 95%
F. Acuosa	1.75	1.66-1.85	5.49	5.05-6.01
F. AcOET	0.6	0.52-0.67	10.8	8.50-14.30

En el Cuadro 6 se presentan los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de mortalidad de larvas L₃ del nematodo *H. contortus*, el cual nos muestra que nuevamente la F. AcOET obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad con un valor de 60.91% a una concentración de 5 mg/mL y a la concentración más baja 0.3125 mg/mL presentó un 31.39%, a comparación de F. Ac. que obtuvo un valor de 29.77% a 5 mg/mL y un 22.36% a 0.3125 mg/mL, en ambos casos se observó un efecto dependiente de la concentración.

Los datos del cálculo de CL₅₀ y CL₉₀ se muestran en el Cuadro 7 donde F. AcOET presento una CL₅₀ de 1.36 mg/mL y una CL₉₀ de 16.7 mg/mL, siendo más bajas que las de F. Ac la cual obtuvo una CL₅₀ de 3.16 y CL₉₀ de 56.5 mg/mL.

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad de larvas L₃ de *H. contortus* por efecto de los tratamientos F. AcOET y F. Ac. a diferentes concentraciones.

	% Mortalidad de larvas L ₃			
	F. AcOET		F. Ac.	
Concentración	Promedio +DE	%Ajustado	Promedio +DE	%Ajustado
MetOH 2%	0±0.00	0 ^e	-	-
PBS	-	-	0± 0.00	0 ^c
TBZ 5 mg/mL	100±0.00	100 ^a	100±0.00	100 ^a
0.3125 mg/mL	31.39±2.82	31.39 ^d	22.36±7.51	22.36 ^b
0.625 mg/mL	33.10±5.81	33.10 ^d	23.44±5.28	23.44 ^b
1.25 mg/mL	43.91±4.43	43.91 ^c	26.40±7.87	26.40 ^b
2.5 mg/mL	50.45±3.32	50.45 ^c	27.42±3.27	27.42 ^b
5 mg/mL	60.91±4.32	60.91 ^b	29.77±6.18	29.77 ^b
CV		5.07		10.2
R ²		0.99		0.98

Letras iguales en la misma columna indican que los valores no difieren estadísticamente según prueba de Tukey (p=0.05); n=4 (cuatro pozos).

Cuadro 7. Datos de CL₅₀ y CL₉₀ de fracciones F. Acuosa y F. AcOET en el porcentaje de mortalidad de larvas L₃

Tratamiento	Mortalidad larvas L ₃ (%)			
	CL ₅₀	IC Limites 95%	CL ₉₀	IC Limites 95%
F. Acuosa	3.16	2.80-3.62	56.5	39.63-87.29
F. AcOET	1.36	1.24-1.49	16.7	13.38-21.89

Con los resultados obtenidos de ambas pruebas se procedió a realizar el fraccionamiento químico bio-dirigido de F. AcOET, donde se obtuvieron en total 76 fracciones a través de cromatografía en columna abierta (**Cuadro 3**). Se analizaron las fracciones colectadas mediante cromatografía CCF para determinar mediante el factor de retención que fracciones eran similares (**Cuadro 8**). Una vez determinadas las fracciones similares se colectaron y se concentraron en un rotaevaporador para eliminar la mayor cantidad de solvente, obteniendo así un total de 11 reuniones.

Cuadro 8. Reuniones obtenidas a partir de las fracciones colectadas y su peso final en mg.

Fracción	Reunión	Peso reunión (mg)
1-13	1	25.7
14-20	2	13.5
21-28	3	44.5
29-31	4	12.1
32-35	5	18.9
36-42	6	27.2
43-48	7	22.2
49-57	8	44.2
58-66	9	55.2
67-74	10	103.1
75-76	11	339.8

Posteriormente se hizo una prueba para determinar qué reunión era la más activa en cuanto a la inhibición de eclosión de huevos y mortalidad de larvas L₃ de *H. contortus*, en donde se evaluaron a 10 mg/mL cada una de las reuniones, dando como resultado lo siguiente (**Cuadro 9**).

En donde se muestra que todas las reuniones presentaron porcentajes mayores al 90% de actividad, sin embargo, R6 y R7 presentan un porcentaje de inhibición de eclosión de huevo del 100% a las 48h post-confrontación, siendo estas dos fracciones las más bioactivas. En lo que respecta a la mortalidad de larvas L₃ las reuniones R4 y R5 presentaron un 100 y 95.41% de efectividad respectivamente.

Cabe mencionar que se realizaron primero las pruebas para evaluar mortalidad de larvas y posteriormente las pruebas de EHI; sin embargo, las reuniones R4 y R5 no fueron tomadas a consideración para evaluarlas contra huevos de *H. contortus* porque se perdieron y no se pudieron recuperar para poder evaluarlas en EHI.

Cuadro 9. Porcentajes de EHI y mortalidad por efecto de las reuniones de F. AcOET a 10 mg/mL

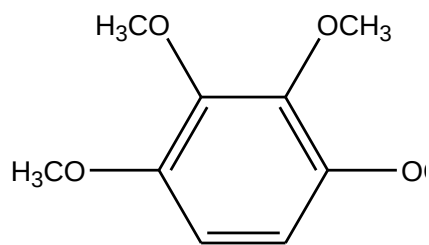
Tratamiento	% EHI		Mortalidad larvas (%)	
	Promedio +DE	%Ajustado	Promedio +DE	%Ajustado
MetOH 2%	8.73±3.91	0 ^d	0 ±0.00	0 ^f
TBZ 5 mg/mL	100± 0.00	100 ^a	100 ± 0.00	100 ^a
R1	91.37± 2.29	90.55 ^c	15.47 ± 4.36	15.47 ^d
R2	93.03± 2.28	92.36 ^{bc}	22.33 ± 3.55	22.33 ^d
R3	98.47± 1.38	98.32 ^{ab}	65.53 ± 1.46	65.53 ^c
R4	-	-	100 ± 0.00	100 ^a
R5	-	-	95.41 ± 3.42	95.41 ^b
R6	100±0.00	100 ^a	25.94 ± 3.88	25.94 ^d
R7	100±0.00	100 ^a	27.09 ± 6.63	27.09 ^d
R8	99.73± 0. 47	99.70 ^a	15.94 ± 3.49	15.94 ^d
R9	95.96±1.43	95.57 ^{abc}	4.21 ± 1.94	4.21 ^e
R10	98.51±1.41	98.37 ^{ab}	4.05 ± 2.42	4.05 ^e
R11	95.99 ±3.52	95.60 ^{abc}	15.83 ± 1.76	15.83 ^d
CV		2.51		7.58
R ²		0.99		0.99

Los resultados de los perfiles cromatográficos del análisis GC-MS de las muestras con mayor actividad nematocida contra larvas L₃ y huevos de *H. contortus* muestran que la reunión R4 (**Cuadro 10**) está constituida principalmente por esteroides, ácidos grasos de cadena larga esterificados y libres.

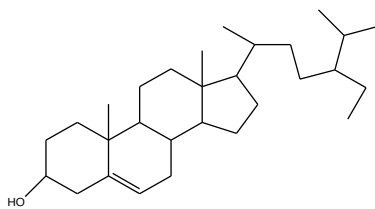
Los componentes más abundantes son el 1,2,3,4-tetrametoxibenceno (18.96%; TR=14.13 min) y β -sitosterol (13.49%; TR=34.69 min). Otros constituyentes que se encuentran en menor proporción son stigmasterol (7.24%; TR= 34.12 min) y 5 α -stigmaster-3,6-diona (6.67%; TR=38.70 min) (**Figura 18**). Sus estructuras químicas se observan en la **Figura 17**.

Cuadro 10. Composición química de R4 de fracción F. AcOET del sustrato agotado de *P. ostreatus*

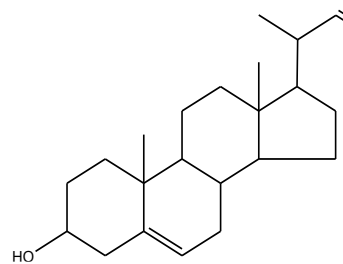
Compuesto	Peso molecular	Tiempo de retención (min)	% en muestra
1,2,3,4-tetrametoxibenceno	198.09	14.13	18.96
β -sitosterol	414.71	34.69	13.49
Estigmasterol	412.69	34.14	7.24
5 α -stigmast-3,6-diona	428.7	38.70	6.67
Campesterol	400.68	33.83	4.37
Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	392.6	35.33	2.84
4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olido	324.5	25.62	1.80
Linoleato de metilo	294.48	22.78	1.78
Friedelan-3-ona	426.7	37.41	1.59
γ -Sitostenona	412.7	36.23	1.57
Spinasterona	410.7	35.46	1.22
4 α -4-Metil stigmast-22-en-3-ona	426.7	37.66	1.13
γ -Palmito lactona	254.4	22.91	1.03
Palmitato de metilo	270.46	20.76	0.69



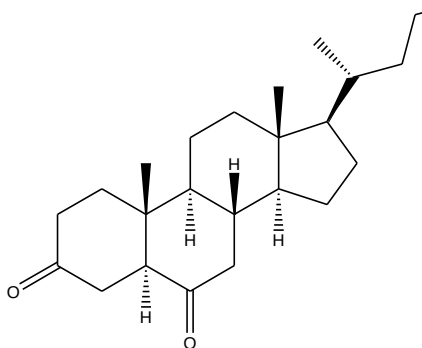
a)



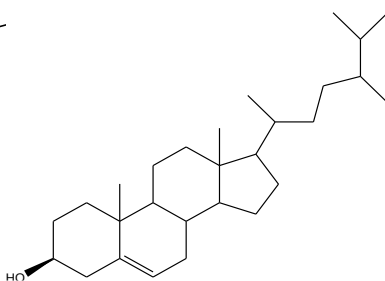
b)



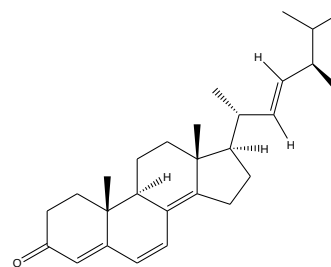
c)



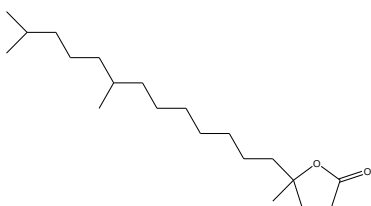
d)



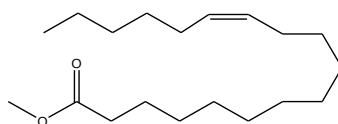
e)



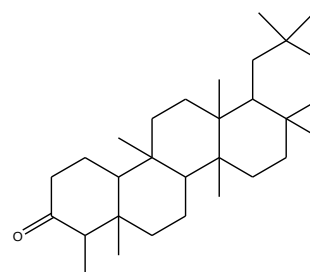
f)



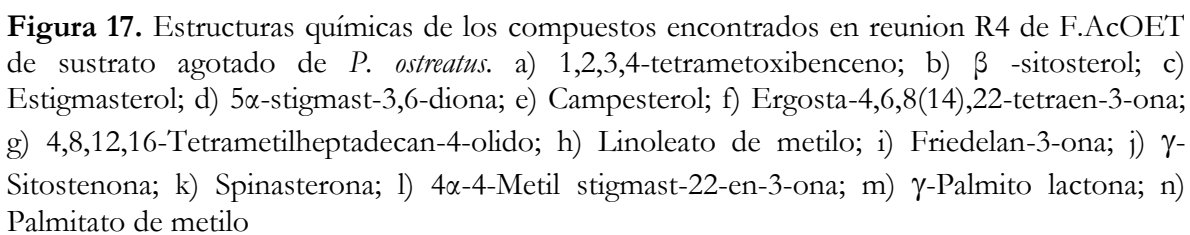
g)



h)



i)



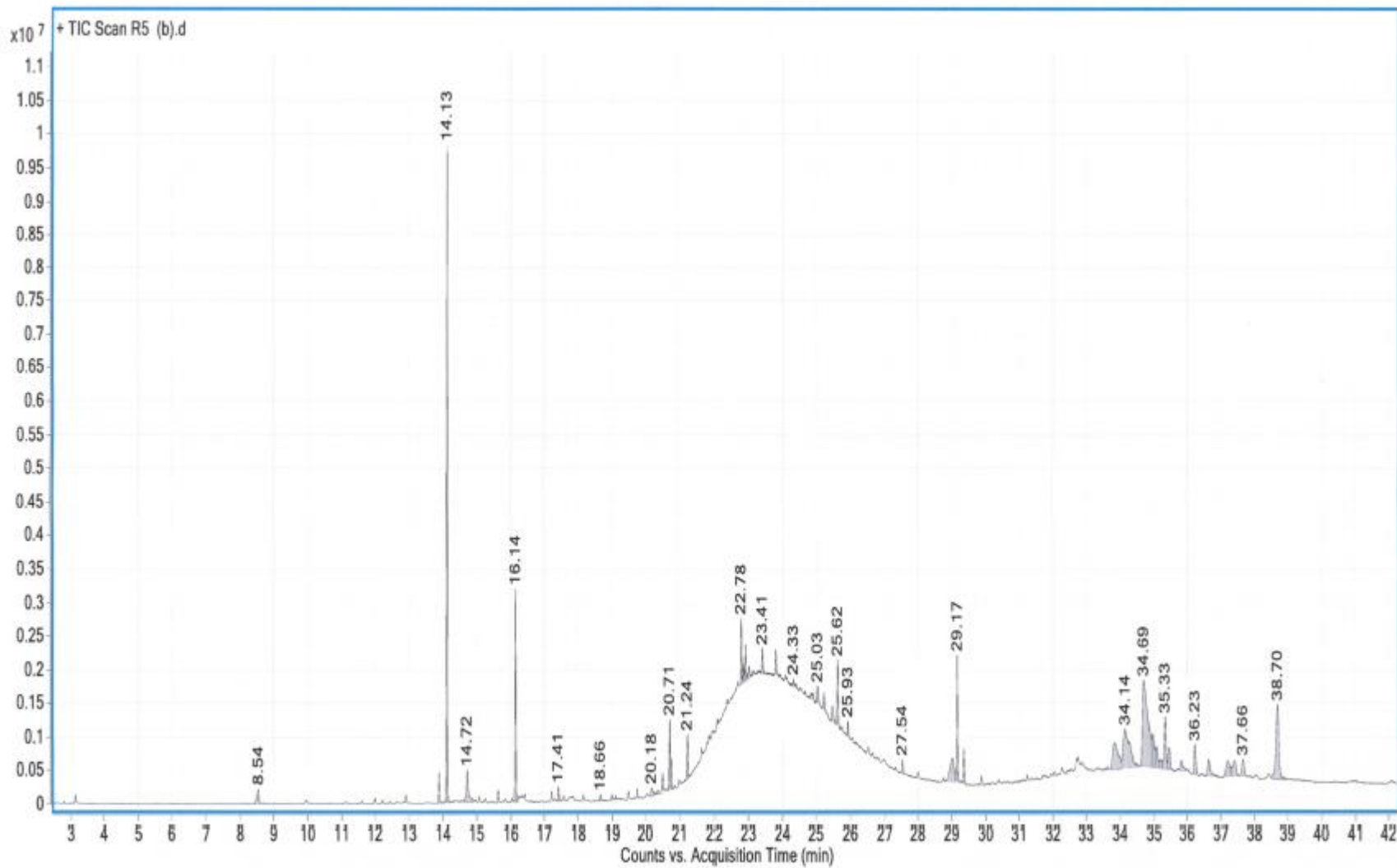


Figura 18. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R4 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*

Los componentes de la reunión R5 (**Cuadro 11**) son principalmente compuestos aromáticos (**Figura 19**), entre los que se encuentran *o*-hidroxicinamato de metilo (26.17%; TR=28.50 min), *o*-hidroxibenzaldehído (17.42%; TR= 12.76 min) y vainillina (11.81%; TR=13.38 min) (**Figura 20**). Los demás compuestos identificados son minoritarios con menos del 5.00%.

Cuadro 11. Composición química de R5 de fracción F. AcOET del sustrato agotado de *P. ostreatus*.

Compuesto	Peso molecular	Tiempo de retención (min)	% en muestra
<i>o</i> -Hidroxicinamato de metilo	194.06	18.50	26.17
<i>o</i> -Hidroxibenzaldehído	122.04	12.76	17.42
Vainillina	152.05	13.38	11.81
Apocinina	166.06	14.75	4.27
<i>o</i> -Hidroxi-acetofenona	136.05	14.01	3.16
Dimetil imidazolidinetriona	142.04	10.20	2.49
2,4'-Metilenbis(fenol)	200.08	21.73	2.04
Etosuximida	141.16	10.20	1.18
Linoleato de metilo	294.48	22.77	0.97
Coniferaldehído	178.18	18.33	0.96
2,2-Dimetil-N-fenetilpropionamida	205.15	17.92	0.96
Bisfenol F	200.08	22.53	0.95
Butirovainillona	194.09	18.27	0.66
2-Undecanona	270.26	20.75	0.63

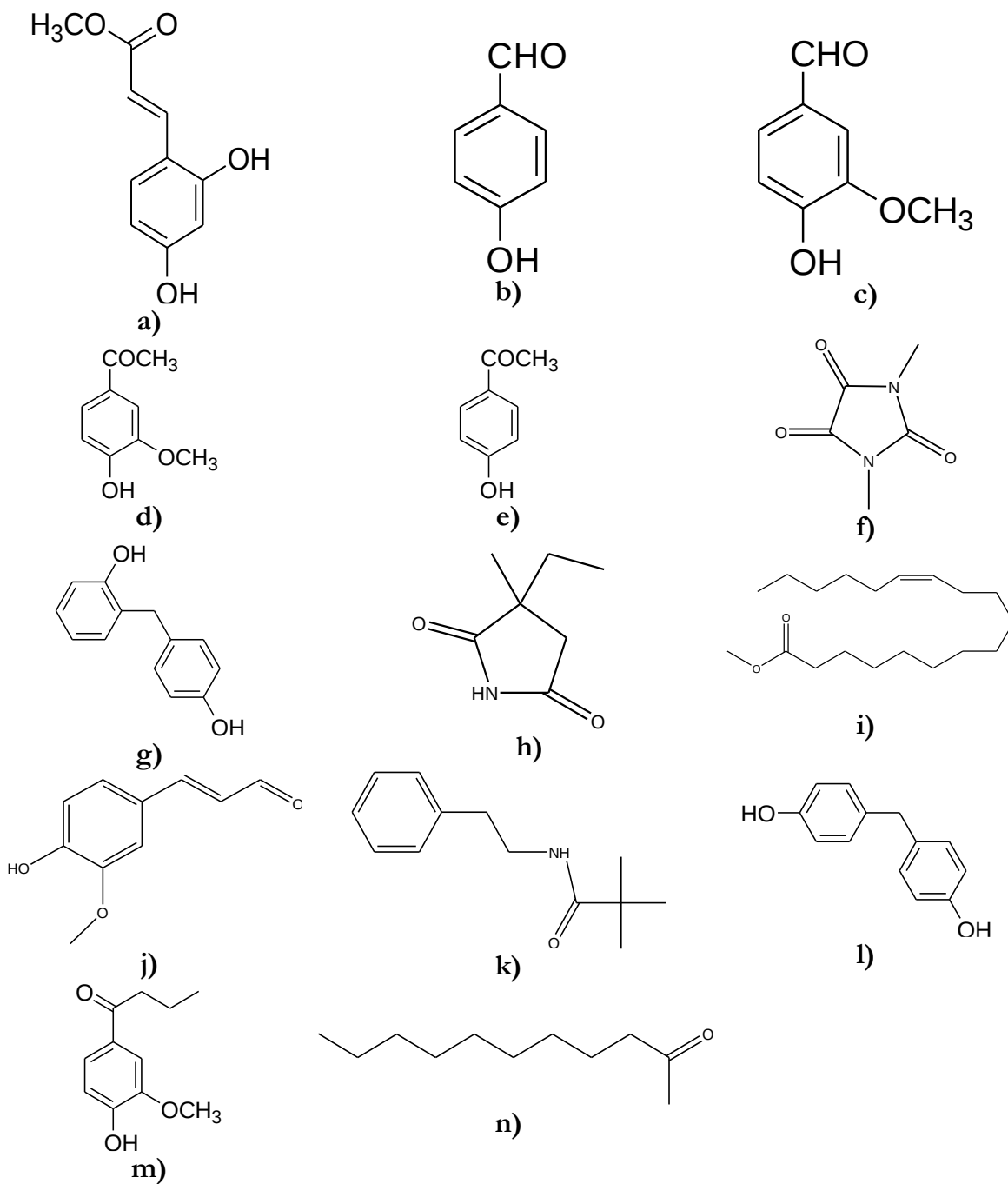


Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R5 de F.AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*. a) *o*-Hidroxicinamato de metilo; b) *o*-Hidroxibenzaldehído; c) Vainillina; d) Apocinina; e) *o*-Hidroxí-acetofenona; f) Dimetil imidazolidinetriona; g) 2,4'-Metilenbis(fenol); h) Etosuximida; i) Linoleato de metilo; j) Coniferaldehído; k) 2,2-Dimetil-N-fenetilpropionamida; l) Bisfenol F; m) Butirovainillona; n) 2-Undecanona

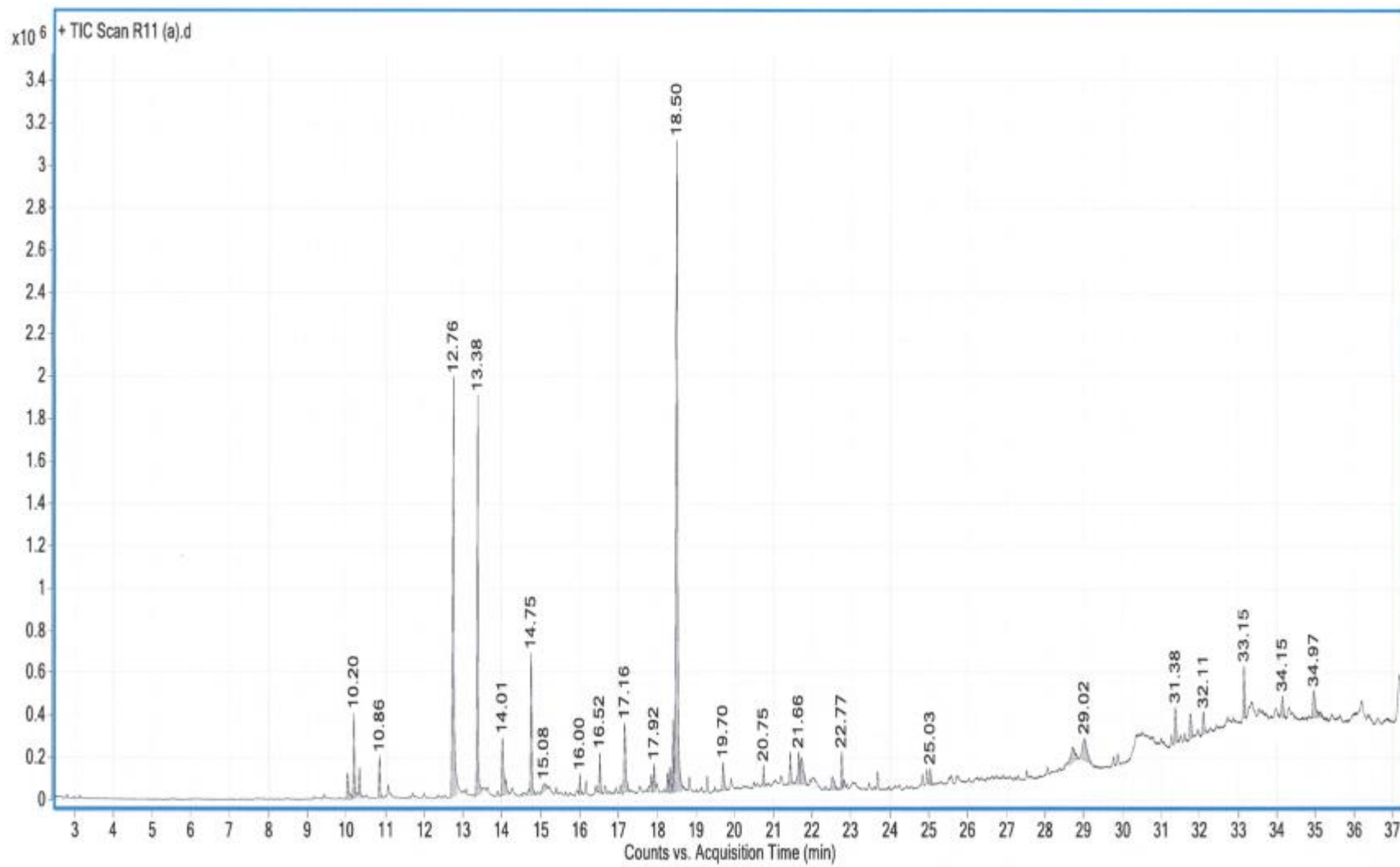


Figura 20. Espectro del perfil cromatográfico de reunión R5 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*

Los principales componentes de la reunión R6 (**Cuadro 12; Figura 21**) son el *o*-hidroxicinamato de metilo (46.53%; TR= 18.48 min), *o*-hidroxibenzaldehído (14.38%; TR= 12.73 min), la vainillina (6.96%; TR= 13.37) y el 4,5-dimetil-2-propil oxazol (6.47%; TR= 32.11 min) (**Figura 22**).

Cuadro 12. Composición química de R6 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*.

Compuesto	Peso molecular	Tiempo de retención (min)	% en muestra
<i>o</i> -Hidroxicinimato de metilo	194.6	18.48	46.43
<i>o</i> -Hidroxibenzaldehído	122.04	12.73	14.38
Vainillina	152.05	13.37	6.96
4,5-Dimetol-2-propil-oxazol	141.12	32.11	6.47
Paeonol	166.06	14.77	1.51

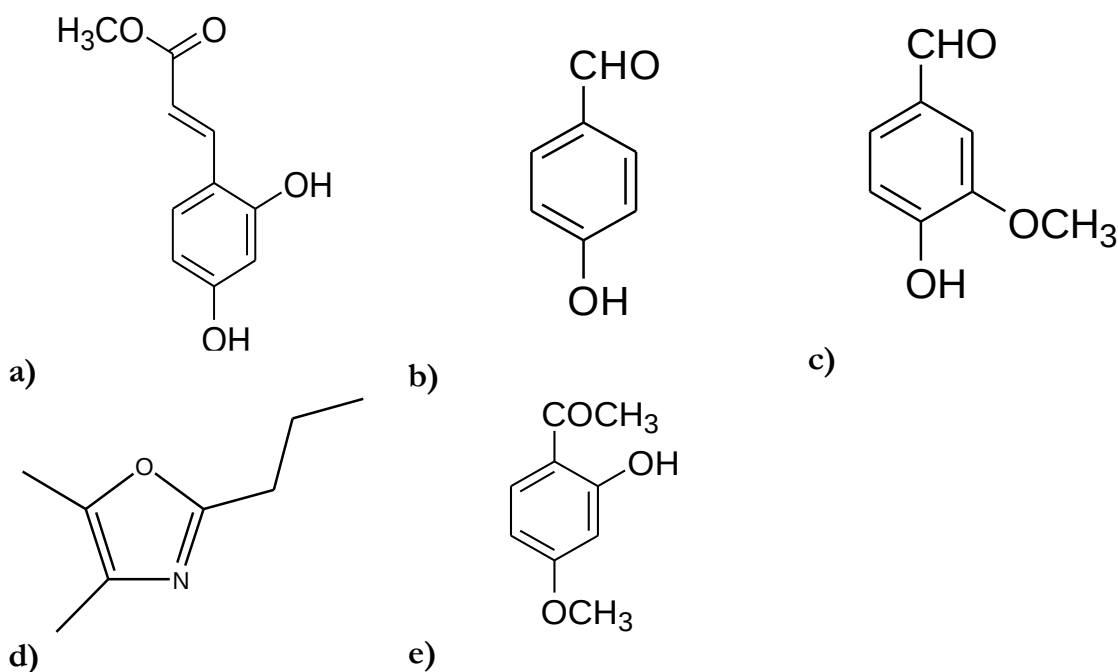


Figura 21. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R6 de F.AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*. a) *o*-Hidroxicinimato de metilo; b) *o*-Hidroxibenzaldehído; c) Vainillina; d) 4,5-Dimetol-2-propil-oxazol; e) Paeonol

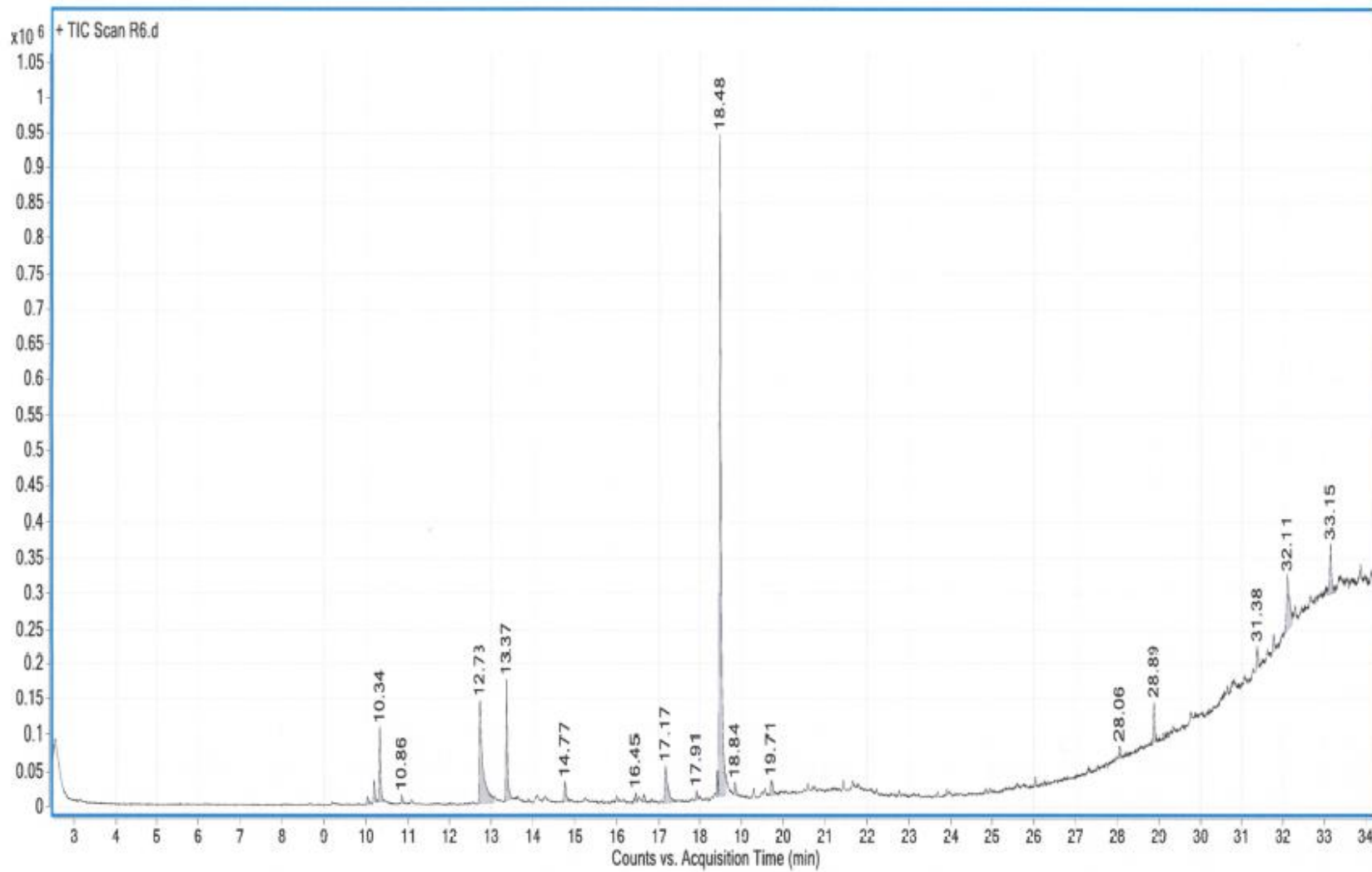


Figura 22.Espectro del perfil cromatográfico de reunión R6 de fracción F. AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*

En lo que respecta a la reunión R7 (**Cuadro 13**) los componentes mayoritarios no fueron identificados, sin embargo, de los componentes que si lograron identificarse (**Figura 23**) se encuentran el *o*-hidroxicinamato de metilo (6.79%; TR= 18.49 min), el 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (5.16%; TR= 17.30 min) (**Figura 24**).

Cuadro 13. Composición química de R7 de fracción F. AcOET de *P. ostreatus*.

Compuesto	Peso molecular	Tiempo de retención (min)	% en muestra
<i>o</i> -hidroxicinamato de metilo	194.06	18.49	6.79
4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído	182.06	17.30	5.16
Stigmasta-3,5-dien-7-ona	410.35	35.69	2.48
Escualeno	410.39	33.15	1.57
<i>o</i> -hidroxibenzaldehído	122.04	12.73	1.29
Vainillina	152.05	13.37	1.04
Ácido benzoico	122.04	9.33	0.50

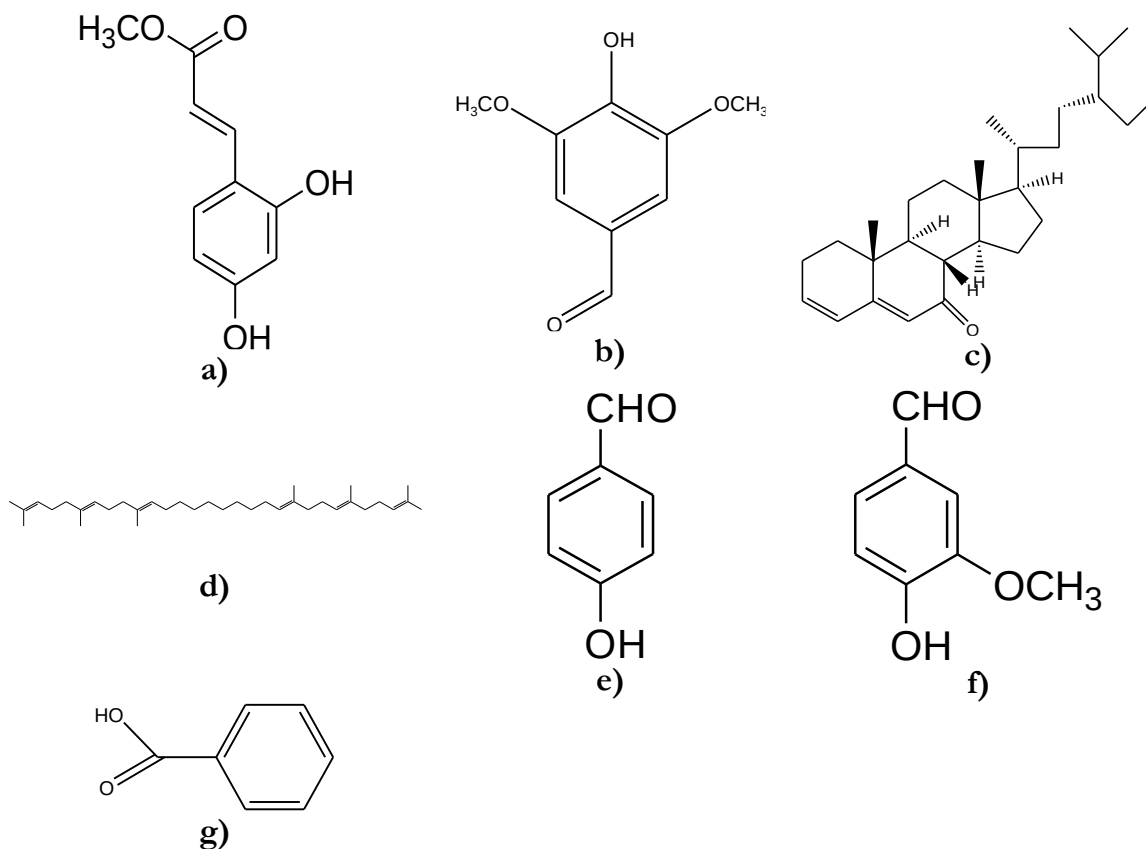


Figura 23. Estructuras químicas de los compuestos encontrados en reunión R7 de F.AcOET de sustrato agotado de *P. ostreatus*. a) *p*-hidroxicinamato de metilo; b) 4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído; c) Stigmasta-3,5-dien-7-ona; d) Escualeno; e) *p*-hidroxibenzaldehído; f) Vainillina; g) Ácido benzoico

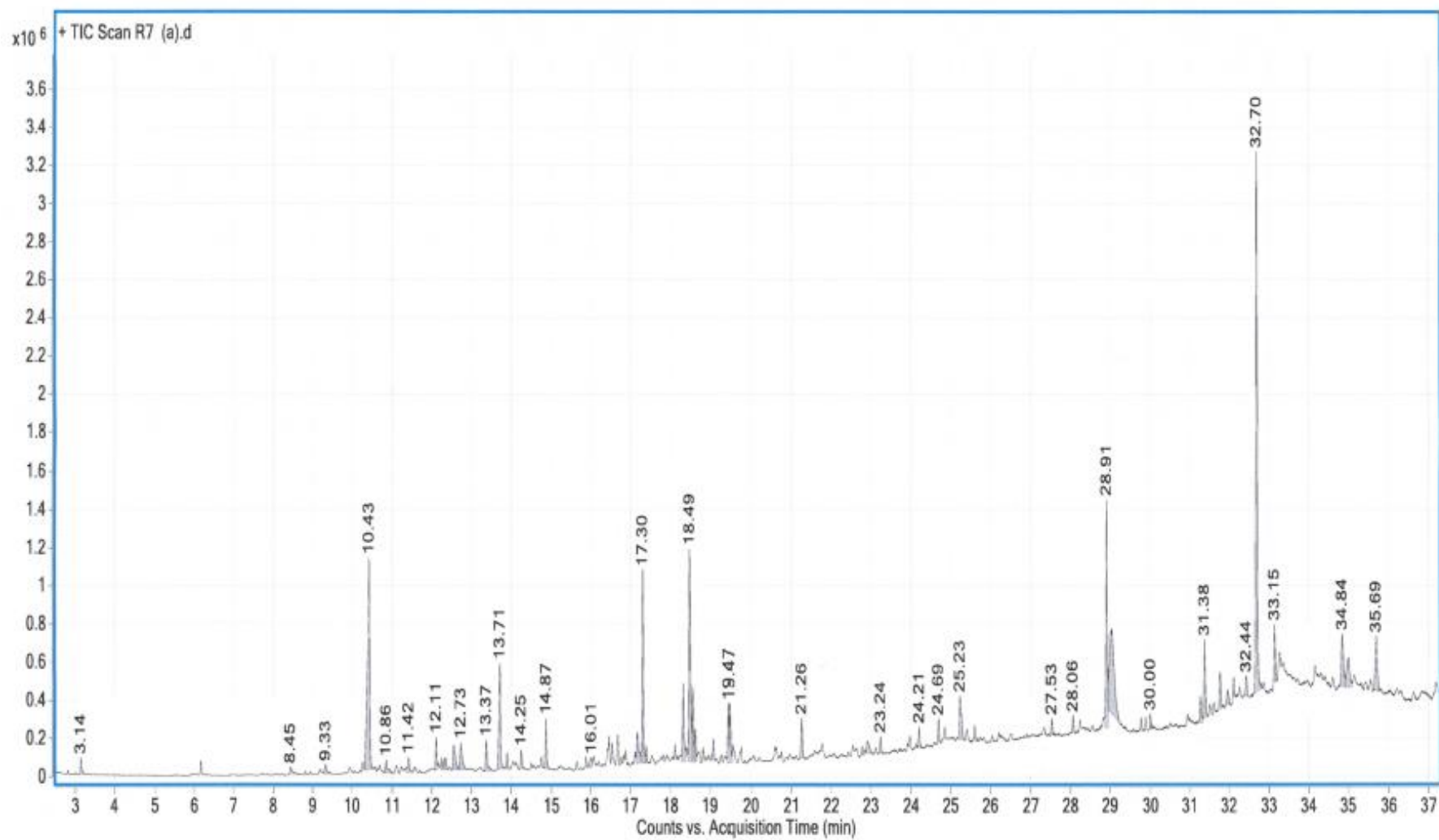


Figura 24.Espectro del perfil cromatográfico de reunión R7 de fracción F. AcOET de *P. ostreatus*

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que al evaluar una fase polar (F. Ac) y una no polar (F. AcOET) obtenidas de una separación líquida-líquida contra huevos y larvas L₃ de *H. contortus* la mayor actividad de inhibición de eclosión de huevos y mortalidad de larvas la presentó F. AcOET con un 78.80% y 60.91% respectivamente. A comparación de F. Ac que presentó un 76.89% de EHI y un 29.77% de mortalidad de larvas. Ambas facciones presentaron un porcentaje similar de EHI; sin embargo, la diferencia radical se presentó al evaluar la mortalidad de larvas, y estos resultados son más importantes debido a que se está atacando a larvas que en el estadio en el que se encuentran, es decir L₃ pueden infectar al rumiante cuando son ingeridas mediante la ingesta de pasto, por lo que con esta acción el ciclo biológico de *H. contortus* puede dar inicio y así propagar más rápido la infección. Por tal motivo se decidió realizar el fraccionamiento químico de F. AcOET.

En el cual se obtuvieron 11 reuniones y al ser evaluadas contra *H. contortus* se obtuvo que las reuniones R4 y R5 presentaron un 100 y 95.4% de mortalidad de larvas y las reuniones R6 y R7 un 100% de EHI.

El cultivo de hongos comestibles va en aumento con los años generando así una cantidad considerable de residuos agrícolas, por cada kilogramo de hongos comestibles se generan cinco kilogramos de sustrato agotado (SMS) por lo que se buscan formas de reutilización o reciclaje para su aprovechamiento nuevamente (Finney *et al.*, 2009; Ishihara *et al.*, 2018).

Estudios recientes sobre las posibles aplicaciones del SMS de diferentes especies de hongos comestibles mencionan que se puede utilizar en biorremediación de agua, suelos y sustratos contaminados con plaguicidas, utilización en otros cultivos agrícolas, alimentación animal, acuicultura y como control de plagas y enfermedades (Rinker, 2002).

Enfocándonos en la utilización del SMS como control de plagas y enfermedades podemos decir que es una ventaja para el control de nematodos gastrointestinales (NGI), ya que actualmente los fármacos con propiedades antihelmínticas para combatir los NGI ha desencadenado el problema de resistencia antihelmíntica reduciendo la eficacia de los tratamientos, además causan un impacto importante en el ambiente al ser desechados directamente en el suelo por las heces fecales de los animales (Castañeda- Ramirez *et al.*, 2020).

Se han realizado estudios donde se evalúan extractos de SMS de diferentes especies de hongos comestibles donde se demuestra que poseen actividad nematocida, tal es el caso de Marques-Ferreira *et al.*, (2019) en donde evaluaron el efecto del SMS de *Flammulina velutipes* contra larvas de *Panagrellus* sp, un nematodo de vida libre utilizado como alimento para peces. En tal estudio reportan que obtuvieron un porcentaje de reducción del 43 y 57% en 24 y 48 h respectivamente.

En otro estudio realizado por Tanimola y Adedokun, (2020) se evaluaron la actividad nematocida del extracto acuoso de *P. floridanus* (PF), *P. tuberregium* (PT) y el sustrato agotado de *P. tuber-regium* (PT-SMS) con concentraciones de 0, 2.5, 5, 10 y 20% (v/v) sobre la eclosión de huevos y la mortalidad de juveniles de segundo estadio (J₂) de *Meloidogyne incognita* (MI) y *M. javanica* (MJ). Los extractos acuosos de PF, PT y PT-SMS al 20% v/v inhibieron significativamente la eclosión de huevos de *M. incognita* en un 98, 96 y 94%, respectivamente. Todos los extractos inhibieron significativamente la eclosión de huevos de *M. javanica* en comparación con el control, pero PT 10%, PT 20%, PF 20%, PT-SMS 10% y PT-SMS 20% v/v se destacaron con una inhibición del 100% de la eclosión de huevos.

Por su parte Valdez-Uriostegui *et al.*, (2021) evaluaron el efecto de los extractos hidroalcohólicos del micelio, basidiomas y del sustrato agotado de *P. ostreatus* contra *H. contortus* cuyos resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de micelio de *P.*

ostreatus contra huevos y larvas de *H. contortus* fue del 93 y 96.8% a 12.8 y 240 mg/ml respectivamente a las 72 h postconfrontación. El extracto de sustrato agotado produjo una actividad antihelmíntica a las 48 y 72 h de 77 y 87.2%, respectivamente, sobre la eclosión de *H. contortus* y contra las larvas obtuvo un 11.3% a una concentración de 200 mg/mL a las 72 h.

No hay reportes de estudios químicos bio-dirigidos del SMS para evaluar su actividad nematocida, por lo que en el presente estudio se ha explorado más la actividad nematocida del SMS al realizar un fraccionamiento guiado del extracto más activo para así poder identificar los componentes químicos responsables de la actividad nematocida. Las reuniones que presentaron mayor actividad ovicida o larvicida fueron analizadas mediante una cromatografía GC-MS donde se identificaron los compuestos presentes en cada reunión. Se encontraron principalmente compuestos esteroides, ácidos grasos como 1,2,3,4-tetrametoxibenceno, β -sitosterol, stigmasterol, compuestos aromáticos como *o*-hidroxibenzaldehído, vainillina, 4,5-dimetil-2-propil oxazol, *o*-hidroxicinamato de metilo.

Hay estudios donde se reporta la actividad biológica de extractos orgánicos que contienen algunos de los compuestos que encontramos, tal es el caso del estudio realizado por Rizo-Borrego *et al.*, (2019) reportaron la presencia de ácidos grasos (oleico, linoleico, lignocérico, elaidico, palmítico, palmitelaidico y esteárico), sustancias como alcanfor (2,4-Decadienal) y fitoesteroides (Estigmasterol y β -sitosterol) en el aceite de las semillas de *Jatropha curcas* L. al ser evaluado en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, estos compuestos presentan efectos como nematocidas, larvicidas, insecticidas y repelentes (Caboni *et al.*, 2012).

En un estudio notificado por Romero-Cortes *et al.*, (2019) señalan la presencia de vainillina, ácido vainillico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, guaiacol, glucovainillina, alcohol vainillico y furfural en zumo de vainilla y vanillinay además evaluó su actividad antifúngica contra *Alternaria alternata* obteniendo un efecto positivo. Por

otro lado, Cruz-Arévalo *et al.*, (2020) dan a conocer compuestos como galactitol, D-mannitol, D-glucitol, ácido adípico, ácido esteárico, escualeno y β -sitosterol en una fracción de *Pleurotus eryngii* que fue evaluada contra huevos y larvas (L₃) de *H. contortus*.

Otro compuesto como el palmitato de metilo ha sido reportado con actividad acaricida (Wang *et al.*, 2010), y en otro estudio realizado por Salinas-Sánchez *et al.* (2020) se demostró su actividad insecticida contra *Melanaphis sacchari* Zehntner.

En otro estudio por Pineda-Alegría *et al.* (2020) donde evaluaron la actividad nematicida de diferentes ácidos grasos y β -sitosterol notifican que β -sitosterol presento un 26.55% de inhibición de eclosión de huevos, sin embargo, al ser mezclado con otros ácidos grasos el porcentaje que obtuvo se encontró en un rango del 60-100% de actividad.

De los demás compuestos identificados no se tiene reportada alguna actividad biológica contra parásitos; sin embargo, es posible que al estar en conjunto con otros compuestos estos formen una sinergia para poder obtener un efecto nematicida.

Como se menciona anteriormente no hay estudios del fraccionamiento químico bio-dirigido del SMS de hongos comestibles por lo que este estudio puede servir de referencia para futuras investigaciones.

10. CONCLUSIÓN

Como resultado de la investigación se demostró que la fracción de acetato de etilo (F. AcOET) del sustrato agotado de *P. ostreatus* fue quien obtuvo mayor actividad nematicida contra *H. contortus* con un porcentaje mayor al 70% de actividad nematicida. Con estos resultados se aprueba la hipótesis planteada y se concluye que el sustrato agotado del hongo comestible *P. ostreatus* puede ser utilizado como una alternativa de control contra nematodos gastrointestinales principalmente *H. contortus* debido a que cinco de las reuniones obtenidas del fraccionamiento químico presentaron un porcentaje ovicida o larvicida mayor al 90% y los compuestos identificados pertenecen a ácidos grasos, compuestos aromáticos y fitoesteres, los cuales se han reportado en diferentes estudios con actividad nematicida.

11. PERSPECTIVAS

Evaluar en un estadio diferente a huevos o larvas L₃ de *H. contortus* para determinar el porcentaje de actividad nematicida.

Evaluar a diferentes concentraciones el extracto integro y sus diferentes fracciones contra otro modelo de nematodo.

Realizar estudios del mecanismo de acción de los diferentes compuestos encontrados y así determinar de una manera más precisa su función.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, K.A., Taylor, M. Stubbings, L.A. 2012. Sustainable worm control strategies for sheep. *A technical manual for veterinary surgeons and advisers*. 3rd edition.

Aguilar-Marcelino, L. 2012. Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Texcoco, Edo. De México. 178 p.

Aguilar-Marcelino, L., Sánchez-Vázquez, J.E., Mendoza-de-Gives, P. 2017. Uso biotecnológico de productos obtenidos a partir de *Pleurotus* spp. en el control de nematodos parásitos de importancia pecuaria. *En: La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus* spp. José E. Sánchez y Daniel J. Royse, Eds. Chiapas, México: ECOSUR. pp 297-309.

Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C. M. 2009. Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 151(1-2): 75–85.

Álvarez-Gutiérrez, P., Palacios-Pola, G. Pérez-Luna, Y. 2016. Los hongos como alimentos funcionales. *En: G. Palacios Pola, A. Caballero Roque, T. Alemán Santillán and F. Duhart. Alimentación Sustentable en Chiapas: Hoy y mañana*. 1ª ed. Chiapas: Colección Montebello. pp. 65-70.

Aparicio-Medina, J.M., Paredes-Vanegas, V., González-López, O., Navarro-Reyes, O., 2012. Impacto de la ivermectina sobre el ambiente. *La Calera*. 11 (17):64-66.

Arece, J., Rodríguez, J.G. 2010. Dinámica de las larvas infestantes de estrongídeos gastrointestinales en ovinos en pastoreo. *Pastos y Forrajes*.33(1), 1.

Asaduzzaman Khan, M.D., T. Mousumi, 2012. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Review International* 28(3): 313-329.

Becerra-Nava, R., Alonso-Díaz, M.A., Fernández-Salas, A., Quiroz, R.H. 2014. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4): 285-290.

Beltrão-Molento M., Silva-Fortes F., Santos- Pondelek D.A, De Almeida-Borges F., De Souza- Chagas A.C., Torres-Acosta J.F. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*; 180(1-2): 126- 32.

Benavidez, E. 2009. Principales enfermedades que afectan la producción ovina en el trópico. *Spei Domus* 5 (11).

Benyon, S.A. 2012 Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology*.189:113-124.

Beyene, T. 2016 Veterinary drug residues in food-animal products: Its Risk factors and potential effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science and Technology* 7:285

Caboni, P.; Ntalli, N. G.; Aissani, N.; Cavoški, I., Angioni, A. 2012. Nematicidal activity of (E, E)-2,4 decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agriculture. Food and Chemistry*. 60 (4):1146-1151.

Cala, A.C., Chagas, A.C., Oliveira, M.C., Matos, A.P., Borges, L.M., Sousa, L.A., Souza, F.A., Oliveira, G.P. 2012. *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. And

Trichilia clausenii C. Against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*. 130(2), 98-102.

Cordero del Campillo, M., Rojo-Vázquez, F. 2000. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana de España.

Cano-Estrada, A., Romero-Bautista, L. 2016. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75-80.

Carvalho, C.O., Chagas, A.C.S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L.G., Chaves, F.C.M., Stephan, M.P., Bizzo, H.R, Amarante, A.F.T. 2012. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*.183(3-4), 260-268.

Castañeda-Ramírez, G.S., Torres-Acosta, J.F., Sánchez, J.E., Mendoza-de-Gives, P., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., Al-Ani, L, K, T., Sandoval-Castro, C., de Freitas Soares, F.E., Aguilar-Marcelino, L. 2020. "El posible uso biotecnológico de bioproductos de setas comestibles para el control de nematodos parásitos vegetales y animales". *BioMed Research International*.

Chang, S.T., and S. P. Wasser. 2012. The role of culinary medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 95-134.

Coffey, L. And Hale, M. 2012. Tools for Managing Internal Parasites in Small Ruminants: Pasture Management. *National sustainable agricultura information service*. ATTRA USDA

Cohen, R., L. Persky, Y. Hadar, 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (5): 582-594.

Comans-Pérez, R. J., Sánchez, J. E., Al-Ani, L. K. T., González-Cortázar, M., Castañeda-Ramírez, G. S., Mendoza-de Gives, P., Sánchez-García, A.D., Millán-Orozco, J., Aguilar-Marcelino, L. 2021. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biological Control*, 152, 104420.

Cuevas-Padilla E.J, Aguilar-Marcelino L, Sánchez J.E, González-Cortázar M, Zamilpa-Álvarez A., Huicochea-Medina M., López-Arellano M.E., Mendoza-de-Gives P, Hernández-Velázquez VM, González-Garduño R. 2018. A *Pleurotus* spp. Hydroalcoholic fraction possess a potent *in vitro* ovicidal activity against the sheep parasitic nematode *Haemonchus contortus*. In: Updates on tropical mushrooms. Basic and applied research. José E. Sánchez, Gerardo Mata, Daniel J. Royse Editors. 1st. Edition. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur, pp 193-211.

Cuevas-Padilla, E.J. 2019. Evaluación *in vitro* de extractos crudos de *Pleurotus* spp., y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos. México. 66 p.

Cruz-Arévalo, J. 2017. Estudio químico biodirigido de cuerpos fructíferos del hongo comestible *Pleurotus eryngii* con actividad nematocida. Tesis de maestría. El Colegio de la Frontera Sur. Chiapas, México.

Cruz-Arévalo, J., Sánchez, J.E., González-Cortzar, M., Zamilpa, A., Andrade-Gallegos, R.H., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. 2020. Composición Química de una Fracción Antihelmíntica de *Pleurotus eryngii* contra Huevos y Larvas Infecciosas (L₃) de *Haemonchus contortus*. *Biomed Research International*.

Espinal, C., Martínez, C., Amézquita, J. 2006. La cadena de ovinos y caprinos en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No. 125.

Fernández, C., San Andrés, M., Porcel, M.A., Rodríguez, C., Alonso, A., Tarazona, J.V. 2009. Pharmacokinetic profile of Ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 18: 564-575.

Figuerola-Castillo, J.A., Jasso-Villazul, C., Liébano-Hernández, E., Martínez-Labat, P., Rodríguez-Vivas, R.I. Zárate-Ramos, J.J. 2015. Capítulo 3: Examen coproparasitoscópico *En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria*. Rodríguez-Vivas R.I. Editor. AMPAVE-CONASA. México, D.F. pp. 78-128.

Finney, K.N., Changkook, R., Sharifi, V.N., Swithenbank, J. 2009. The reuse of spent mushroom compost and coal tailings for energy recovery: Comparison of thermal treatment technologies. *Bioresource Technology*, 100: 310-315.

Gaitán-Hernández, R., D. Salmenes, R. Pérez Merlo y G. Mata, 2006. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción, 1era. Ed., 2a. Reimp. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver., México, 56 pp

Gaitán-Hernández, R., D. Salmenes D., 2008. Obtaining and characterizing *Pleurotus ostreatus* strains for commercial cultivation under warm environmental conditions. *Scientia Horticulturae* 118 (2): 106-110.

González-Cortázar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M. E., Aguilar-Marcelino, L., Reyes-Guerrero, D. E., Olazarán-Jenkins, S., Mendoza-de-Gives, P. 2018. *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comparative Clinical Pathology*, 27(1), 189-197.

González-Cortazar, M., Sánchez, J.E., Huicochea-Medina, M., Hernández-Velázquez, V.M., Mendoza-de-Gives, P., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Pineda-Alegría, J.A., Aguilar-Marcelino, L. 2020. *In vitro* and *in vivo* nematicide effect of extract fractions of *Pleurotus djamor* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*. 24(3): 310-318.

González-Garduño, R., Córdova-Pérez, C., Torres-Hernández, G., Mendoza-de-Gives, P., Arece-García, J. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 42(2), 125-135.

Hernández, H. A., López, M. N. 2000. Efecto del tratamiento con extractos de plantas medicinales (estañate, epazote, semilla de calabaza, semilla de papaya y ajo) sobre parásitos gastroentéricos en ovinos. Tesis de licenciatura. MVZ. México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Heydari, R.; Pourjam, E. Goltapeh, E. M. 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. *Plant Pathology Journal*, 5:173-177.

Ishihara, A., Goto, N., Kikkawa, M., Ube, N., Ushijima, S., Ueno, M., Ueno, K., Osaki-Oka, K. 2018. Identification of antifungal compounds in the spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. *Journal of Pesticide Science*. 43 (2): 108-113.

Kumar, N., Shankar-Rao, K.T., Varghese, A., Sing Rathor, V. 2013. Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of Parasitic Diseases*. 37(2): 151–157.

Li HG, Zhang K. 2014. Nematode-toxic and their nematicidal metabolites. *In*: Zhang, K., Hyde, K.D. (eds) Nematode-Trapping Fungi: Fungal Diversity Research. Mushroom Foundation. Yunnan, China. 313-375.

Liébano, H.E, López-Arellano, M.E, Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. 2011. Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Special Handbook No. 2. pp. 1-48. Morelos, México, INIFAP.

Marques-Ferreira, J., Neres-Carreira, D., Ribeiro-Braga, F., de Freitas-Soares, F.E. 2019. First report of the nematicidal activity of *Flammulina velutipes*, its spent mushroom compost and metabolites. *3 Biotechnology* 9: 410.

Márquez-Lara, D. 2003. “Nuevas Tendencias Para El Control de Los Parásitos de Bovinos En Colombia. Una Estrategia Sostenible Para El Siglo XXI. Tibaitatá Corpoica.”

Martínez, O. M. C. 2010. Mecanismo de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nemátodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Tesis en cotutela presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Francia: Université de Toulouse.

Martínez-Carrera, D., P. Morales., M. Sobal., M. Bonilla., W. Martínez., Y Mayett 2012. Los hongos comestibles, funcionales y medicinales, su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. *In*: Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo (Agrociencias). Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F. pp: 449-474.

Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra., A. Tovar-Palacio., N. Torres., M. E. Meneses., M. Sobal-Cruz., P. Morales-Almora., M. Bonilla-Quintero., U. H. Escudero.,

I. Tello-Salgado., T. Bernabé-González., W. Martínez-Sánchez., Y. Mayett. 2016. Contribución de los hongos comestibles funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. *In*: Martínez-Carrera D., J. Ramírez Juárez (eds); Ciencia, tecnología e innovación en el sistema agroalimentario de México. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México, pp: 581-640.

Medina, P; Guevara, F; La O, M; Ojeda N; Reyes, E. 2014. Resistencia Antihelmíntica En Ovinos: Una Revisión de Informes Del Sureste de México y Alternativas Disponibles Para El Control de Nemátodos Gastrointestinales. *Pastos y Forrajes* 37 (3): 257–63.

Melgarejo, E. 2015. Algunos usos de los hongos silvestres de Bolivia en el contexto sudamericano. *Kempffiana* 11(1): 48-65.

Mendoza de Gives P., Valero Coss R.O. 2009. Uso de hongos nematofagos: una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado, Folleto Técnico 7:13-17.

Miranda, M. Evaluación del Sustrato Post-Producción de Hongos Comestibles *Pleurotus ostreatus* en la Alimentación de Cuyes. (Tesis Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2013. P. 3.

Nieto, I., Chegwin, C. 2010. Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 169-178.

Okorie, C.; Ononuju, C., Okuwujiako, I. 2011. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. *International Journal of Agriculture and Biology* (Pakistan), 00: 401–405.

Olalla-Herbosa, R., Tercero-Gutiérrez, M. 2011. Parasitosis comunes internas y externas. Consejos desde la oficina de farmacia. *JOUR Offarm* 30 (4)

Olazarán-Jenkins, S., López-Arellano, M. E., Mendoza-de Gives, P., Olmedo-Juárez, A. Evaluación de la resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales a bencimidazol en ovinos en el estado de puebla. *Investigaciones científicas y agrotecnológicas para la seguridad alimentaria*, 343.

Pineda-Alegría, J.A. 2016. Evaluación *in vitro* de una fracción metanólica del hongo *Pleurotus djamor* (0123) contra huevos y larvas (L₃) del nematodo parásito *Haemonchus contortus*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Jiutepec, Morelos, México.

Pineda-Alegría, J.A., Sánchez-Vázquez, J.E., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Cuevas-Padilla, E.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. 2017 The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*. 20(12)

Pineda-Alegría, J.A., Sánchez, J.E., González-Cortazar, M., von Son-de Fernex E., González-Garduño, R., Mendoza-de Gives, P., Zamilpa, A., Aguilar-Marcelino, L. 2020. *In vitro* nematocidal activity of commercial fatty acids and β -sitosterol against *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology* 94, e135, 1–4.

Páez-León, S.Y. 2018. Actividad nematocida de extractos de sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* y *Moringa oleifera* contra nematodos de importancia agropecuaria. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos Jiutepec, Morelos.

Rinker, D.L. 2002. Handling and using "spent" mushroom substrate around the world. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. 43-60.

Rinker, D.L. 2017. Usos de sustrato de hongos gastados. *En Hongos comestibles y medicinales* eds CZ Diego y A. Pardo - Giménez.

Rizo-Borrego, A., Soca-Pérez, M., García-Marrero, D.E., Fuentes-Castillo, A., Giupponi-Cardoso, P., Arece-García, J., Cepero-Casas, L. 2019. Actividad acaricida del aceite de las semillas de *Jatropha curcas* L. en larvas de *Rhiciphephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Pastos y Forrajes*. 42 (3).

Rodríguez-Barrera, T.M. 2021. Evaluación *in vitro* del efecto letal en huevos y larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* diez extractos crudos de diferentes mezclas de sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de posgrado. Centro de Investigaciones Biológicas, Morelos, México.

Rodríguez-Vivas, R. I., G. Laerte, A.A. Pérez de León, H. Silva V., J.F. de Jesús Torres-Acosta, H. Fragoso S., D. Romero S., R. Rosario C., F. Saldierna, y D. García C. 2017. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. Pp. 61-74.

Romero-Arenas, O., M. A. Martínez., M. A. Damián., B. Ramírez., y J. López-Olgún. 2015. Producción de hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(6): 1229-1238.

Romero-Cortes, T., Pérez-España, V.H, López-Pérez, P.A., Rodríguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V.J., Aparicio-Burgos, J.E., Cuervo-Parra, J.A. 2019 Antifungal activity of vanilla juice and vanillin against *Alternaria alternata*. *CyTA - Journal of Food*, 17:1, 375-383.

Royse, D.J., J.E. Sánchez, 2017. Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. *In: Sánchez, J.E., D. Royse (eds.). La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, pp. 17-25.

Royse, D.J., J. Baars, Q. Tan. 2017. Current overview of mushroom production in the world. *In: Zied, D.C., A. Pardo-Giménez (eds.), Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications.* John Wiley and Sons-Blackwell, Nueva York. Pp. 5-13.

Salinas-Sánchez, D.O., Peña-Chora, G., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Hernández-Velázquez, V.M. Tagle, L.J., Sotelo-Leyva, C. 2020. Efecto insecticida de una fracción de acetato de etilo de *Serjania schiedeana* Schltdl (Sapindaceae) contra *Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae). *Acta Agrícola y Pecuaria* 6

Sánchez, J. E. y Royse, D. 2001. La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. (1a. Ed.). México: Edit. Noriega Editores.

Saval, S. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Revista de la sociedad Mexicana Biotecnología y Bioingeniería A.C.* ISSN 0188-4786. (16):14-46

Schneider-Orelli, O. 1947. Entomologisches Praktikum: Einführung in die land- und forstwirtschaftliche Insektenkunde. Sauerländer Aarau, Germany.

Sepúlveda-Vázquez, J., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C.A., Martínez-Puc, J.F., Chan-Pérez, J.I. 2018. La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79-95.

Soca, M., Roque, E., Soca, M. 2005. Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*, pp 175-185.

Suarez, V. 2001. "Helmintinths control on grazing ruminants and environmental risks in South America". *Veterinary Research* 33. 65: 563-573.

Suárez Arango, C., Nieto, I. J. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8.

Tanimola, A.A., Adedokun, O.M. 2020. Nematicidal potentials of aqueous extracts of two mushroom species and spent mushroom substrate on *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*. *Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment*. 16(2): 110-119.

Téllez-Téllez M. 2018. Hongos patógenos, especies amigables con el ambiente. *Inventio. La génesis de la cultura universitaria en Morelos*.

Torres-Acosta, J. F. J., Chan-Pérez, I., López-Arellano, M. E., Rosado-Aguilar, J. A., Soberanes-Céspedes, N., Neri-Orantes, S., Alonso-Díaz, M., Martínez-Ibáñez, F., Osorio-Miranda, J., Vargas-Magaña, J.J., Encalada-Mena, L. 2015. Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes. *In Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria* (pp. 355-403). AMPAVE-CONASA.

Torres-Vásquez, P., Prada-Sanmiguel, G.A., Márquez-Lara, D. 2007. Resistencia antihelmíntica en los nemátodos Gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 13:59:76

Valdez-Uriostegui, L.A., Sánchez-García, A.D., Zamilpa, A., Sánchez, J.E., González-Garduño, R., Mendoza-de-Gives, P., Castañeda-Ramírez, G.S., González-Cortazar, M., Aguilar-Marcelino, L. 2021. *In vitro* evaluation of hydroalcoholic extracts of mycelium, basidiomata and spent substrate of *Pleurotus ostreatus* against *Haemonchus contortus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24: 62.

Vargas-Rodríguez, C.F. 2006. FAMACHA control de Haemonchosis en caprinos. *Agronomía mesoamericana*, 17(1): 79-88

Vázquez, V.M. 2000. Agentes etiológicos y ciclos de vida de los nemátodos gastrointestinales. En: Memorias 1er. Curso Internacional “Nuevas perspectivas en el diagnóstico y control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes”. (Eds. F. Torres, A. Aguilar & A. Ortega). Yucatán, México. p. 1

Velasco-Cruz, K.S. 2017. Evaluación del extracto hidroalcohólico del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en contra de *Hymenolepsis diminuta*. (Tesis de licenciatura) México, D.F.

Verdejo S. 2005. Control Biológico de nematodos Fitoparasitos, El control Biológico de Plagas y Enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura Mediterránea; Publicacions de la Universitat Jaume I.D.L., Castelló, Pamplona, España; pp:153-169.

Wang, Y.N., Wang, X.H., Jin, Y.S., Bu, C.Y., Cheng, J., Zhao, L.L., Shi, G.L. 2010. Assessment of the contact toxicity of methyl palmitate on *Tetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 14: 1372–1377.

Worku, E., Kiros, A., Asgedom, H., Tadesse, B. 2017 Alternative Control Methods of Gastrointestinal Nematode Infections in Small Ruminants: Biological Method and Use of Medicinal Plant Extracts. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 3 (2)11-28.

Zapata, S.R., Velásquez V.R., Herrera O.L.V., Ríos O.L, Polanco E.D.N. 2016. Prevalencia de Nematodos Gastrointestinales en Sistemas de Producción Ovina y Caprina bajo Confinamiento, Semiconfinamiento y Pastoreo en Municipios de Antioquia, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 27(2), 344 - 354. Doi:10.15381/rivep.v27i2.11647

Dictiotopografía

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2017). Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (consultado el 26 octubre 2019).

Gaitán-Hernández, R. 2015. Cultiva hongos comestibles: Aprovecha sus propiedades nutritivas y medicinales. Instituto de Ecología. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>

Garibay-Origel, R. 2018. XII Congreso Nacional de Micología, Xalapa, Veracruz <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>