



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

“Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L₃) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MANEJO
DE
RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

MVZ. Tania María Rodríguez Barrera

Directora: Dra. Maura Téllez Téllez (CIB-UAEM)

Co-directora: Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)

CUERNAVACA, MORELOS

25 de Mayo 2021



Comité Tutorial

- Dra. Maura Tellez Tellez
- Dra. Liliana Aguilar Marcelino
- Dra. Ma. de Lourdes Acosta Urdapilletal
- Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez
- Dr. Alejandro García Flores
- Dr. Edgar Martínez Fernández

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) por la formación académica.

Al CENID-SALUD ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP, por el financiamiento para realizar el presente estudio por medio del proyecto Proyecto aprobado en la convocatoria de Problemas Nacionales del CONACyT, 2017 con número de identificación: 2017-01-6052.

A la Dra. Maura Tellez Tellez por aceptarme en su equipo de trabajo, su amistad y la confianza depositada en mí.

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino: por su valiosa amistad, apoyo y aportaciones realizadas en este proyecto.

A la Dra. Ma. de Lourdes Acosta Urdapilletal: Por su gran conocimiento, clases tan dinámicas, consejos, ánimo y estar presente cuando necesitaba apoyo.

Al Dr. José Ernesto Sánchez : Por sus buenos comentarios y correcciones realizadas en el presente trabajo.

Al Dr. Alejandro García Flores: por compartir sus conocimientos los cuales fueron de vital importancia en el proyecto y excelentes comentarios.

Al Dr. Edgar Martínez Fernández: Por sus excelentes comentarios y conocimientos

Resumen

1. Introducción	1
2. <i>Haemonchus contortus</i>	4
2.1 Ciclo biológico de <i>H. contortus</i>	5
3. Resistencia antihelmíntica.....	7
4. Métodos de control alternativos al uso de químicos.....	12
4.1 Manejo del pastoreo	12
4.2 Inmunización con larvas y vacunas.....	13
4.3 Herbolaria	13
4.4 Agujas de cobre.....	13
4.5 Control biológico.....	14
4.6 Hongos comestibles.....	14
5. <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
6. Justificación	26
7. Objetivo General	27
7.1 Objetivos específicos	27
8. Hipótesis.....	28
9. Material y métodos	29
9.1 Localización.....	30
9.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>	31
9.3 Obtención de huevos <i>H. contortus</i>	32
9.4 Obtención de larvas infectantes de <i>H. contortus</i> (L ₃)	34
9.5 Eliminación de la vaina de las larvas infectantes de <i>H. contortus</i> ...	36

10. Bioensayos	37
10.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto letal en huevos de <i>H. contortus</i> de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>.....	37
10.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto letal en larvas de <i>H. contortus</i> de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>.....	38
11. Análisis estadístico	39
12. Análisis bromatológico.....	39
13. Resultados	40
13. Discusión.....	44
14. Conclusión	47
15. Literatura citada.....	48

Tabla 1. Resistencia antihelmíntica en México (Márquez, 2013)	8
Tabla 2 Toxicidad de la ivermectina presente en el estiércol de bovinos u ovinos (Pérez et al., 2018).	11
Tabla 3 Clasificación taxonómica de <i>Pleurotus</i> (Index fungorum, 2018).....	16
Tabla 4 Compuestos aislados a partir del hongo comestible <i>Pleurotus</i> spp. y su eficacia contra diferentes grupos taxonómicos de helmintos(Aguilar-Marcelino et al., 2017).	20
Tabla 5 Porcentajes de la composición de las diez Mezclas	30
Tabla 6 Evaluación del efecto letal en larvas de <i>H. contortus</i> de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>	41
Tabla 7 Evaluación de la inhibición de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>	42
Tabla 8 PROBIT de la inhibición de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i>	43
Tabla 9 PROBIT de la mortalidad de larvas <i>H. contorus</i>	43
Tabla 10. Análisis bromatológico de los extractos de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>	44

Ilustración 3 Partes del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	18
Ilustración 4 Ciclo de vida del hongo (Kuhar <i>et al.</i> , 2013).....	19
Ilustración 5 <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
Ilustración 6 Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de <i>P. ostreatus</i>	31
Ilustración 7 Obtención de muestra directamente del recto de ovino infectado.	33
Ilustración 8 Proceso de maceración y tamizado de la muestra para la obtención de huevos de <i>H. contortus</i>	33
Ilustración 9 Proceso Limpieza con sacarosa al 40%, Gradiente de sacarosa para recuperar huevos en proceso de limpieza	34
Ilustración 10 Proceso del coprocultivo para la obtención de larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	35
Ilustración 11 Técnica del embudo de Baermann.....	36
Ilustración 12 Eliminación de la vaina	37
Ilustración 13 Elaboración de bioensayos	39

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antihelmíntica de 10 mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus* contra huevos y larvas de *H. contortus*. Para este propósito, se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad de larvas de *Haemonchus contortus*. Se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus* para posteriormente realizar bioensayos de los diez extractos a seis concentraciones (0.315-10 mg/mL). Como resultado los 10 extractos presentaron actividad nematocida contra huevos y larvas, el AT6 presentó el mayor porcentaje de inhibición de eclosión de huevos (98-99%) a las 48 h de exposición. El tratamiento AT5 y AT8 fueron los extractos que mostraron el mayor porcentaje de mortalidad de larvas (79%) a las 72 h de exposición,

Los tres tratamientos con mayor actividad nematocida contra *H. contortus* mostraron el siguiente valor nutricional para rumiantes, incluyendo materias seca (> 90%) proteína cruda (<10%), fibra cruda (20-50%) cenizas (<5%) y extracto etéreo (<3%). La utilización de sustrato degradado del hongo comestible *P. ostreatus* tiene actividad antihelmíntica contra los huevos y las larvas de *H. contortus*.

1. Introducción

Dentro de los parásitos internos que afectan a los rumiantes se encuentran los nematodos gastrointestinales (NGI), que pertenecen a la clase Nematoda, el origen de la palabra proviene del griego “nemas” o “nematos”, es decir, filiforme (que tiene forma de hilo). Son endoparásitos de forma cilíndrica, cubiertos por una cutícula compuesta por quitina, que están presentes en la mayoría de los rumiantes de diferentes regiones del mundo; su mayor o menor presencia se ve determinada por factores bióticos y abióticos, como el clima, el manejo animal y la edad de los huéspedes expuestos a praderas contaminadas (Byron *et al.*, 2018). Las enfermedades causadas por los NGI producen pérdidas económicas por baja ganancia de peso o inclusive hasta la muerte como es el caso de pequeños rumiantes, lo que hace imprescindible realizar investigaciones en estos parásitos en términos de conocer su epidemiología, susceptibilidad a medicamentos antihelmínticos y alternativas no químicas de control (Byron *et al.*, 2018), los sistemas de producción animal, el impacto económico causado por los NGI se refleja en el retraso de crecimiento, desnutrición, anorexia, producción de carne y lana e incluso causa la muerte en corderos jóvenes; se ha estimado que el costo anual del tratamiento contra algunos parásitos es superior a 19,251,600.00 millones de pesos (Zaragoza *et al.*, 2019).

El nematodo *Haemonchus contortus* presenta la mayor prevalencia a nivel mundial y nacional con un 37% en el abomaso (estómago verdadero) de ovinos (González-Garduño *et al.*, 2011). El uso inadecuado y frecuente de los productos químicos (antihelmínticos *e.g* Lactonas macrocíclicas), ha dado origen al problema de la resistencia, se ha demostrado que la superficie de las células somáticas de los

nematodos posee receptores acetilcolino nicotínicos (nAChR), los cuales normalmente permanecen cerrados en ausencia de agentes de afinidad, pero pueden abrirse en presencia de sustancias de afinidad específica como los antihelmínticos; la unión de dichos compuestos con estos receptores produce despolarización y parálisis espástica de los músculos de los nematodos, y como resultado, ocurre la expulsión de los parásitos (Márquez, 2013). Los ovinos se ven afectados por este problema ya que el efecto de los antihelmínticos está siendo limitado por la “resistencia” (Martínez y Cruz, 2009).

Cabe mencionar que los usos de estos productos químicos amenazan al medio ambiente y contribuyen de manera importante al desequilibrio en el entorno ambiental, ya que algunos medicamentos especialmente el fenbendazol y el oxfendazol, debido a que los mismos son excretados en gran cantidad en las heces de los rumiantes poniendo en riesgo a organismos benéficos como los escarabajos estercoleros (*Onthophagus* y *Aphodius*), lombrices del suelo y ácaros (*Caloglyphus mycophagus*) (Quintero, 2018). En los ecosistemas de pastizal, la producción forrajera depende estrechamente del reciclaje de la materia orgánica producida y de la cantidad de elementos minerales disponibles. Las heces depositadas en el suelo ocupan una cierta superficie, esta puede ser considerable si las heces se acumulan disminuyendo directa o indirectamente la superficie del pastizal, el papel de los insectos coprófagos (esencialmente coleópteros y dípteros) se presenta como fundamental, en particular cuando existe una masa importante de estiércol depositada por el ganado.

Los escarabajos coprófagos participan más activamente en el desmenuzamiento, la fragmentación y el transporte vertical de los excrementos, en la medida en que estos organismos están activos durante una gran parte del año también las lombrices del suelo contribuyen al enterramiento (Lumet *et al.*, 2005). Por tal

motivo, es urgente y necesario buscar métodos alternativos complementarios para disminuir el uso de los productos químicos antihelmínticos.

El uso de los hongos es una opción para un pretratamiento de los residuos agroindustriales ya que poseen enzimas lignocelulolíticas agrupadas en celulasas, hemicelulasas y ligninasas (Ovando, 2018). Los materiales comúnmente utilizados como fuente de carbono incluyen la paja de trigo, avena, centeno, sorgo y algodón, virutas de madera y de corteza, subproductos de algodón, heno, tallos de planta de maíz, plantas y desperdicios de café, tusa de mazorca, hoja de té, cáscara de cacahuate, harina de soya, cáscaras de semillas de girasol, desperdicios de alcaucil, desperdicios de yuca, agave, residuos de la industria papelera, hojas de plátano, cactus, yuca, pulpa de cardamomo, fibra de coco, hojas de limón, tallas de pimienta, paja de arroz, bagazo de caña, vainas de frijol, entre otros; a todos estos materiales muy pocas veces se les realiza el uso adecuado y en muchos lugares se convierten en fuentes contaminantes del agua, suelo y ambiente, pero se pueden utilizar para producir hongos comestibles (Ovando, 2018).

Los hongos tienen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: el sistema de hidrólisis, que produce hidrolasas que son responsables de la degradación de polisacáridos, y un sistema ligninolítico oxidativo único, que degrada lignina y abre los anillos de fenilo (Elgorashi *et al.*, 2008).

Los hongos de la pudrición blanca, secretan una o más de las tres enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de lignina, por síntesis endógena y de compuestos aromáticos no fenólicos, en una reacción que genera radicales arilo y alquilo que se anabolizan intracelularmente; la manganeso peroxidasa que oxida componentes fenólicos de la lignina, mediante una reacción de oxidación y la lacasa, que es una glicoproteína extracelular que contiene cobre y que oxida anillos de la lignina. Todas estas enzimas participan en la degradación

bajo condiciones de fermentación en estado sólido, y se ha detectado que ayudan tanto a la infestación del micelio sobre el sustrato como a la degradación de este (Ovando, 2018).

El sustrato degradado de *P. ostreatus* proporciona nutrientes para el animal, así como compuestos secundarios que pueden afectar la biología y supervivencia de nematodos gastrointestinales. La evidencia del sustrato se basa *in vitro* del antihelmíntico y su actividad contra diferentes etapas de la vida los nematodos gastrointestinales. Pero la información nutricional se omite o es escasa.

2. *Haemonchus contortus*

La haemonchosis una enfermedad común y de gran importancia por su incidencia en el abomaso de rumiantes en muchas partes del mundo. La patogenia de la infección por *Haemonchus* es el resultado de la anemia y la hipoproteïnemia causada por la actividad del parásito que filtra la sangre (Gasque, 2008). El nematodo *H. contortus* es un género de nematodo cilíndrico (Ilustración 1), parásitos de rumiantes el cual se encuentra diseminado ampliamente en todo el mundo, pero es más frecuente y dañino en regiones cálidas y húmedas. Siendo *H. contortus*, la enfermedad más dañina dado el grado de complejidad que alcanza para su control (Widiarso, 2018).

H. contortus al entrar en el hospedero se adhiere a las paredes del estómago verdadero conocido como abomaso y utiliza como su principal fuente de alimento el plasma sanguíneo que succiona a través de los pliegues de la pared de este órgano, provocando pérdidas asociadas a reducción en las tasas de crecimiento en animales, bajas condiciones corporales, reducción de la fertilidad, aumento de susceptibilidad a enfermedades de diferentes orígenes e incremento en la

mortalidad (Rivero *et al.*, 2019). Se estima que cerca del 10% del volumen sanguíneo diario es consumido por *H. contortus* (Rodríguez, 2006). Cuyas consecuencias inmediatas se traducen en una disminución de la condición corporal, pérdida del pelaje, decaimiento y bajos niveles de producción. La característica más representativa asociada a una infección con *H. contortus* es el nivel de anemia ya que *H. contortus* es un parásito hematófago y succiona una gran cantidad de plasma sanguíneo provocando una pérdida de proteínas (Rivero *et al.*, 2019).

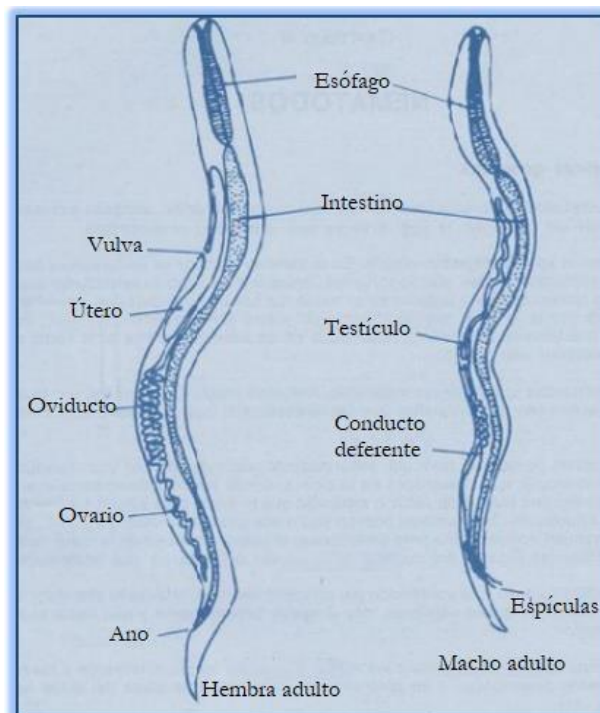


Ilustración 1 Morfología del nematodo *H. contortus* en forma adulta macho y hembra. Fuente: (Sánchez, 2012).

2.1 Ciclo biológico de *H. contortus*

El ciclo de vida del nematodo parásito de ovinos *H. contortus* se divide en 2 fases Fase endógena y exógena (ilustración 2) a continuación se describen dichas fases.

Fase endógena: En las heces se pueden encontrar los huevos y en condiciones óptimas se desarrolla la larva L₁ esto ocurre entre 1 y 2 días, la cual eclosiona e inicia lo que es la larva de vida libre L₂. Finalmente a los 7 días alcanzan su estadio infectante conocido como L₃. Estas larvas migran hacia las partes altas de los pastos para que sean ingeridas por los animales junto con el pasto.

Fase endógena: Cuando la larva infectante (L₃) ha sido ingerida por un nuevo animal susceptible, al ingresar al tubo digestivo, se alimenta y crece en la mucosa las larvas L₄ y L₅, las cuales se le consideran como larvas adultas (Rodríguez, 2016). L₄ y L₅ succionan sangre la actividad de estos irrita la mucosa provocando inflamación, extraen cantidades considerables de sangre y se desarrolla la anemia que se manifiesta por la palidez de la conjuntiva y de las encías, los animales se vuelven indiferentes y se desnutren, el pelo se pone quebradizo y opaco, los animales pierden el apetito y son incapaces de recuperar el peso normal y en ocasiones mueren (Gasque, 2008).



Ilustración 2 Ciclo biológico de *H. contortus*

La fase exógena del ciclo biológico está influida por los factores abióticos como la temperatura, humedad, luz y suelo, mientras que la endógena está relacionada con los factores bióticos del hospedador (Mendoza *et al.*, 2009).

La hipobiosis o desarrollo inhibido es un fenómeno que se define como la inhibición temporal y prolongada, o la interrupción del desarrollo larvario del nematodo en el hospedador. Las larvas en hipobiosis no se desplazan ni se alimentan; su metabolismo celular está reducido, pero no se detiene por completo (Munguía *et al.*, 2018).

Los factores que influyen en el metabolismo regulador son:

- Factores abióticos que afectan a las larvas de vida libre: condiciones ambientales adversas, temperatura, ausencia de humedad, carencia de oxígeno, luz, entre otros (Munguía *et al.*, 2018).
- Factores bióticos del hospedador, tales como la inmunidad, edad, ingestión de gran número de larvas infectantes (Munguía *et al.*, 2018).

3. Resistencia antihelmíntica

La resistencia es definida como 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. Se han tratado de controlar las parasitosis usando productos farmacéuticos de tipo sintético, lo cual ha causado el creciente desarrollo de resistencia antihelmíntica. La cual se presenta cuando se administra

un medicamento en la dosis y forma correcta a un animal infectado sin que actúa eficazmente (Márquez, 2013).

Los antihelmínticos constituyen actualmente el principal método de control de los nematodos de rumiantes en el mundo. Existen varios antihelmínticos (Tabla 1.) con diferentes mecanismos de acción, aunque las avermectinas, los benzimidazoles y los agonistas nicotínicos son los grupos de antihelmínticos más comúnmente usados en rumiantes (Márquez, 2013).

Tabla 1. Resistencia antihelmíntica en México (Márquez, 2013)

Estados de México	antihelmínticos	Géneros	Referencia
Yucatán	Benzimidazoles y Lactonas macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Trichostrongylus</i>	Torres et al. (2003)
Tabasco	Benzimidazoles	<i>Haemonchus</i> <i>Teladorsagia</i> <i>Cooperia</i> y <i>Oesophagostomum</i> .	González et al. (2003)
Tabasco	Benzimidazoles y Lactonas macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> <i>Teladorsagia</i> y <i>Cooperia</i> .	Nuncio et al. (2003)
Tabasco	Benzimidazoles Imidazotiazoles y macrocíclicas	No reportado	Nuncio et al. (2005)
Campeche	Benzimidazoles y Lactonas macrocíclicas	<i>Trichostrongylus</i>	Torres et al. (2007)
Chiapas	Benzimidazoles Imidazotiazoles y macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Trichostrongylus</i>	Sánchez et al. (2008)

Tabasco	Benzimidazoles Imidazotiazoles y macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Trichostrongylus</i>	Medina et al. (2011)
Chiapas	Benzimidazoles Imidazotiazoles y macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> y <i>Teladorsagia</i>	Reyes et al. (2013)
Tabasco	Benzimidazoles Imidazotiazoles y macrocíclicas	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> y <i>Oesophagostomum</i>	Herrera et al. (2013)

Existe información limitada sobre el impacto que los antihelmínticos, o sus metabolitos, sobre el medio ambiente. Sin embargo, a partir de 1980 se han realizado trabajos que evidencian los efectos negativos que tienen en el ambiente algunos antihelmínticos como la fenotiazina que, aunque en desuso, ejercía efectos adversos sobre el crecimiento del trébol, lo que se traducía en una reducción del forraje y, por tanto, en una disminución de la producción. En relación con los benzimidazoles, se ha sugerido que éstos no son totalmente inocuos, a diferencia del efecto residual indeseable que tienen sobre algunos hongos saprofíticos que invaden las heces, especialmente el fenbendazol y el oxfendazol, debido a que los mismos son excretados en gran cantidad en las heces de los rumiantes (Márquez, 2013).

De los antihelmínticos disponibles y actualmente usados por los productores, son las ivermectina, las que probablemente ejercen más efectos negativos sobre el medio ambiente, especialmente en las poblaciones de insectos benéficos asociados al estiércol, principalmente en sus formas larvarias. Diferentes vías de administración de estas drogas conducen a variadas concentraciones en las heces, las cuales, a su vez, influyen las respuestas de los organismos no objetivos,

efectos que van desde toxicidad aguda en larvas y adultos hasta interrupción de la metamorfosis, e incluso, a la interferencia de la reproducción (Márquez, 2013)

La resistencia puede ser intrínseca o adquirida, en la primera un parásito que es naturalmente insensible a una droga, debido a la ausencia de receptores o a la imposibilidad del fármaco para entrar al sitio de acción de esta, como ocurre en la resistencia de los trematodos y cestodos a los endectocidas. La resistencia adquirida se presenta en los parásitos que originalmente son susceptibles al fármaco y después de modificaciones genéticas del parásito las cuales llegan a ser hereditarias estos dejan de ser susceptibles (Márquez, 2013). Estos compuestos son importantes en la prevención y tratamiento de las enfermedades parasitarias, pero es necesario reorientar estas prácticas hacia alternativas de control más efectivas y menos costosas, a causa del surgimiento de la resistencia a los fármacos usados y de los problemas relacionados con la toxicidad (Tabla 2), la contaminación ambiental y los residuos en productos animales (Márquez, 2013). Es necesario buscar métodos alternativos que supere el tradicional uso exclusivo de sustancias químicas.

Los escarabajos estercoleros, de la subfamilia Scarabaeinae (Coleoptera: *Scarabaeidae*) corresponden a uno de los grupos taxonómicos más importantes de organismos asociados al estiércol, estos escarabajos ayudan a mantener limpios los pastizales ganaderos, controlan los parásitos gastrointestinales de los bovinos y las poblaciones de especies plaga de moscas que afectan tanto bovinos como al hombre; intervienen en la aeración y el reciclamiento de nutrientes incrementando la fertilidad del suelo, lo que favorece un mayor crecimiento del pasto también, disminuyen la liberación de metano y otros gases del estiércol que inducen el efecto invernadero incidiendo así, en el cambio climático de nuestro planeta (Pérez et al., 2018).

Diversos estudios relacionada con los efectos adversos de las lactonas macrocíclicas (principalmente ivermectina) sobre organismos benéficos asociados al estiércol es amplia y disminuyen sus poblaciones, para ello existen antagonistas naturales como: los hongos, virus, tardígrados, protozoarios, bacterias, nematodos depredadores de otros nematodos (nematodos caníbales) y ácaros nematófagos (Quintero, 2018). Estos efectos se han documentado usando bioindicadores de diferentes taxones, que incluyen invertebrados terrestres como escarabajos y dípteros coprófagos, lombrices de tierra, colémbolos, ácaros y nematodos de vida libre; así como algunos organismos acuáticos (Pérez *et al.*, 2018).

Tabla 2 Toxicidad de la ivermectina presente en el estiércol de bovinos u ovinos (Pérez *et al.*, 2018).

Dosis ivermectina	género, especie y subfamilia	Toxicidad
Inyectable (0.2 mg/kg).	<i>Onthophagus landolti</i> (Scarabaeinae)	No hubo efecto sobre la mortalidad de adultos. Se inhibió la fecundidad casi totalmente hasta los 14 días PT y en menor grado a los 28 días PT. Se redujo la sobrevivencia larval a los 3 días PT
	<i>Euoniticellus intermedius</i> (Scarabaeinae)	No hubo efecto sobre la mortalidad de adultos, ni sobre la fecundidad. Hubo 100% de

		mortalidad larval 2-7 días PT
<i>Onitis</i> (Scarabaeinae)	<i>alexis</i>	Reducción de emergencia en heces 2-7 días PT. Tiempo prolongado de desarrollo en inmaduros en heces de hasta 3 semanas PT
<i>Diastellopalpus quinquedens</i> (Scarabaeinae)		Mortalidad larval en heces colectadas 2 días PT

4. Métodos de control alternativos al uso de químicos

4.1 Manejo del pastoreo

En las praderas ocurre la fase externa o exógena del ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales hasta producir la larva infectante (L₃), la que es ingerida junto con la pastura cuando los animales se alimentan (Medina *et al.*, 2014). La rotación de potreros proporciona el descanso de la pradera después de ser pastoreada, con lo cual se recupera y crece para poder ser sometida nuevamente al pastoreo. Además del descanso de la pradera, la exposición ambiental prolongada y la desecación producida por la radiación solar disminuyen la viabilidad y el número de L₃ que el animal consumiría normalmente junto con el forraje.

4.2 Inmunización con larvas y vacunas

La inmunización se ha utilizado como método de control alternativo de los nematodos gastrointestinales (Medina *et al.*, 2014). Existe un estudio donde se inocularon 3,700 larvas L₃ de *H. contortus* a corderos, lo que redujo el número de huevos por gramo de heces (HPG); sin embargo, esta inmunización no mejoró la ganancia de peso en ovinos en pastoreo. En cuanto a las vacunas, los avances más importantes han sido el descubrimiento y la caracterización de los antígenos que confieren inmunidad. El antígeno H-11 se ha utilizado para la producción de vacunas contra *H. contortus*, y ya es posible desarrollar esta vacuna de forma comercial. Sin embargo, la producción de antígenos para la vacunación de los ovinos es una estrategia relativamente nueva y no existen suficientes estudios que demuestren su efectividad, por lo que se requiere realizar investigaciones sobre este tema. Asimismo, aun se deben descubrir las vacunas contra los demás géneros de nemátodos parásitos de los ovinos.

4.3 Herbolaria

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 (Medina *et al.*, 2014).

4.4 Agujas de cobre

El óxido de cobre, cuando es administrado en capsulas por vía oral, pasa a través del rumen y se aloja en los pliegues del abomaso, donde libera iones de cobre que ejercen un efecto antihelmíntico las agujas de óxido de cobre reducen las cargas de *H. contortus* entre un 75 y 90 %; pero no mejoran la ganancia de peso de los

animales. A pesar del positivo efecto antihelmíntico del óxido de cobre, se ha demostrado que la acumulación de cobre en el hígado de los animales tratados constituye un riesgo, por lo que el uso de este método alternativo ha sido limitado (Medina *et al.*, 2014).

4.5 Control biológico

En la naturaleza existe gran diversidad de organismos antagónicos a los parásitos que han llegado a tener un impacto beneficioso como controladores biológicos en el caso de los ovinos. Dentro de los principales enemigos naturales de los nematodos gastrointestinales se encuentran las bacterias, los ácaros y los hongos. En varios estudios se evaluó la capacidad de adhesión de las esporas de la bacteria *Pausteria* sp. para disminuir las poblaciones de *H. contortus*, también se estudió la habilidad depredadora del ácaro *Lasioseius penicilliger* sobre larvas infectantes de *H. contortus*, y estas se redujeron en un 79.5 % (Medina *et al.*, 2014; Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017).

4.6 Hongos comestibles

Un método alternativo son los hongos comestibles, de los cuales se estima que la producción nacional fue alrededor de 63,374 ton de hongos frescos en 2014. Se le han atribuido propiedades nutracéuticas principalmente para la salud humana, plagas agrícolas y pecuarias (Pineda-alegría *et al.*, 2017; Cuevas-Padilla *et al.*, 2018), entre las diferentes propiedades medicinales y terapéuticas destacan su uso como: anti-inflamatorios, anti-hipertensivos, cardiotónicos, anti-virales, anti-microbianos, anti-tumorales, anti-cancerígenos, anti-oxidantes, inmunomoduladores, anti-edad, insecticidas y antiparasitaria (nematicidas) (Pérez-Moreno, *et al.*, 2010; Sánchez y Mata, 2012; Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017; Shnyreva *et al.*,

2018).

El valor nutricional de los hongos comestibles es significativo, en base seca contienen de 19 a 35% de proteínas, a diferencia de otros alimentos como la leche en polvo (25.8%), huevos (12.8%), pollo (20.0%), salmón (20%), trucha (19.2%), avena (13%); además de contener aminoácidos esenciales (fenilalanina, metionina, leucina, lisina, valina, isoleucina, treonina y triptófano), además de estos componentes poseen vitaminas del complejo B, vitaminas C y D, niacina, ácido pantoténico, ácidos grasos insaturados (Marín *et al.*, 2018). Los hongos de pudrición blanca son considerados agentes primarios de descomposición porque son capaces de utilizar los desechos agrícolas en su forma original sin que hayan sido sujetos previamente a algún proceso de degradación bioquímico o microbiológico (Shnyreva *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista nutricional, son organismos heterótrofos que utilizan como nutrientes los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los diferentes sustratos. Los residuos agroindustriales utilizados para el cultivo y producción de hongos comestibles proveen las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo necesarias para el desarrollo adecuado de la biomasa fúngica. El carbono, que generalmente está en exceso en los sustratos lignocelulósicos, es utilizado en los esqueletos carbonados de compuestos orgánicos y para obtener energía. El nitrógeno, que suele estar presente en cantidades limitadas, es esencial para la síntesis de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, vitaminas, etc. (Rodríguez *et al.*, 2018).

Los hongos son los principales productores de metabolitos biológicamente activos que tienen efectos potencialmente terapéuticos en mamíferos. Estos metabolitos incluyen más de 200 compuestos bioactivos con actividad nematicida (Pineda-

Alegría *et al.*, 2017). Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía y de carbono para la síntesis de estructuras celulares. Debido a la rígida pared celular, no puede fagocitar al alimento entonces absorben nutrientes simples y solubles que obtiene mediante la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio (Gayosso, 2001).

5. *Pleurotus ostreatus*

En México, dada su gran biodiversidad, existen especies con uso potencial en la medicina tradicional. Se estima que el número de especies del reino de los hongos puede llegar hasta 1.5 millones, 700 especies tienen importancia farmacológica. Varios hongos llegan a producir nematotoxinas como son: *Pleurotus ostreatus* (Tabla 3), *Coprinus comatus*, *Lentinula edodes* y *P. eryngii* (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017).

Tabla 3 La clasificación taxonómica de *Pleurotus* (index fungorum)

Reino	Fungi
Genero	<i>Pleurotus</i>
Nombre científico	Pleurotaceae
División	Basidiomicetes
Clase	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae

El género *Pleurotus* presenta actividad nematocida contra diferentes géneros taxonómicos de nematodos parásitos y de vida libre . Las hifas del hongo contienen una nematotoxina que, tras ponerse en contacto con el nematodo, este se ve rápidamente inmovilizado y digerido por el hongo; se produce micelio que invade por la cavidad oral, el ano y la cutícula del nematodo (Aguilar- Marcelino *et al.*, 2017).

El hongo *Pleurotus* spp. es uno de los géneros más importantes que prosperan en los residuos agroindustriales de México. Se desarrolla abundantemente sobre la pulpa de café, el bagazo de caña de azúcar y el henequén, entre otros materiales lignoselulósicos (Sánchez *et al.*, 2012). Es una especie comestible y también es susceptible de cultivo a escala industrial, lo que proporciona una alternativa excelente. Conocido como seta, oreja blanca, hongo ostra. *P. osteratus* presenta un sombrero en forma de repisa, de 4-14 cm. de diámetro, blanquecino, gris o de color café grisáceo; las láminas son decurrentes, blanquecinas; presenta un pie lateral corto, que en ocasiones puede ser excéntrico; la carne o contexto es blanca o blanquecina, con sabor y olor agradables. Los cuerpos fructíferos crecen en forma gregaria y por lo general imbricados, sobre troncos caídos o en pie, o en diversos restos vegetales (Sánchez *et al.*, 2012).

Entre las partes del hongo *Pleurotus ostreatus* (Ilustración 3) se encuentran las estructuras encargadas de producir las esporas no están distribuidas por todo el cuerpo fructífero, sino que se organizan en una superficie de este (himenio) y la

zona donde se encuentra el himenio sumado a otros elementos se denomina himenóforo (Kuhar *et al.*, 2013).

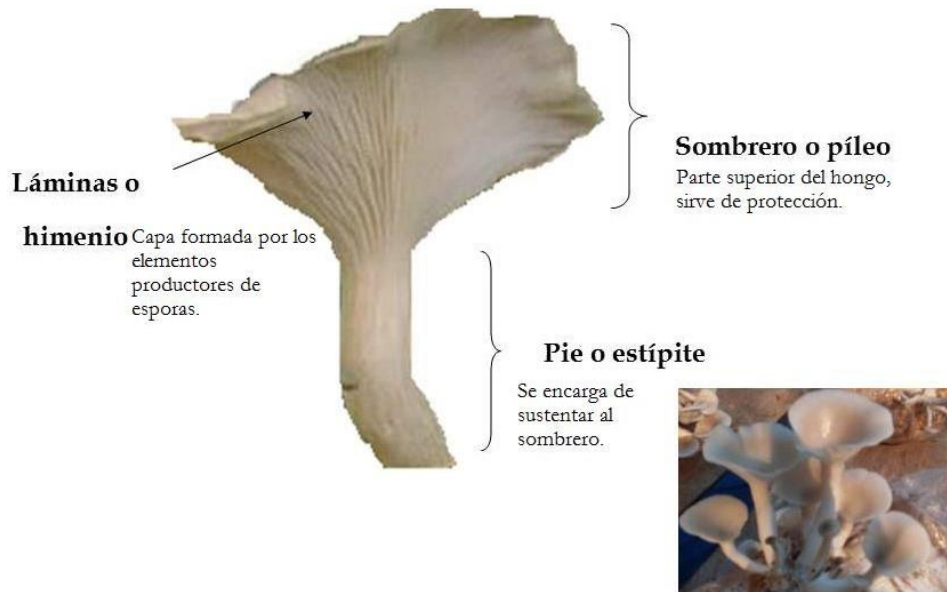


Ilustración 1 Partes del hongo *Pleurotus ostreatus*

Sombrero: Parte superior y carnosa del hongo. Contiene y resguarda al himenio para facilitar el adecuado desarrollo de las esporas. Su superficie está cubierta por la cutícula, fina capa protectora que puede presentar múltiples formas, colores y texturas.

Pie: Punto de sujeción y soporte físico del himenio y sombrero, eleva la zona fértil del hongo y favorece la dispersión de las esporas.

Himenio: Zona fértil del hongo, situada en el interior del sombrero. Puede presentar laminas, tubos o pliegues que generan y almacenan las esporas hasta la dispersión. Algunos hongos presentan un velo o membrana que aísla al himenio en los primeros días.

Laminas: Tabiques del himenio, en sus caras verticales desarrollan basidios, estructuras microscópicas que producen las esporas. A veces presentan laminillas intercaladas que actúan como segunda capa protectora.

Micelio: Tejido orgánico compuesto de delgados filamentos tubulares llamados hifas, es el hongo propiamente dicho el ser vivo que crece bajo la superficie del suelo y que, en momentos puntuales genera hongos para reproducirse sexualmente.

En materia de reproducción (Ilustración 4) puede ser por vía sexual o asexual. En la reproducción sexual son: la plasmogamia que es la fusión de los protoplastos, cariogamia o fusión de un solo núcleo; y meiosis, que es una división formando núcleos haploides (Kuhar *et al.*, 2013).

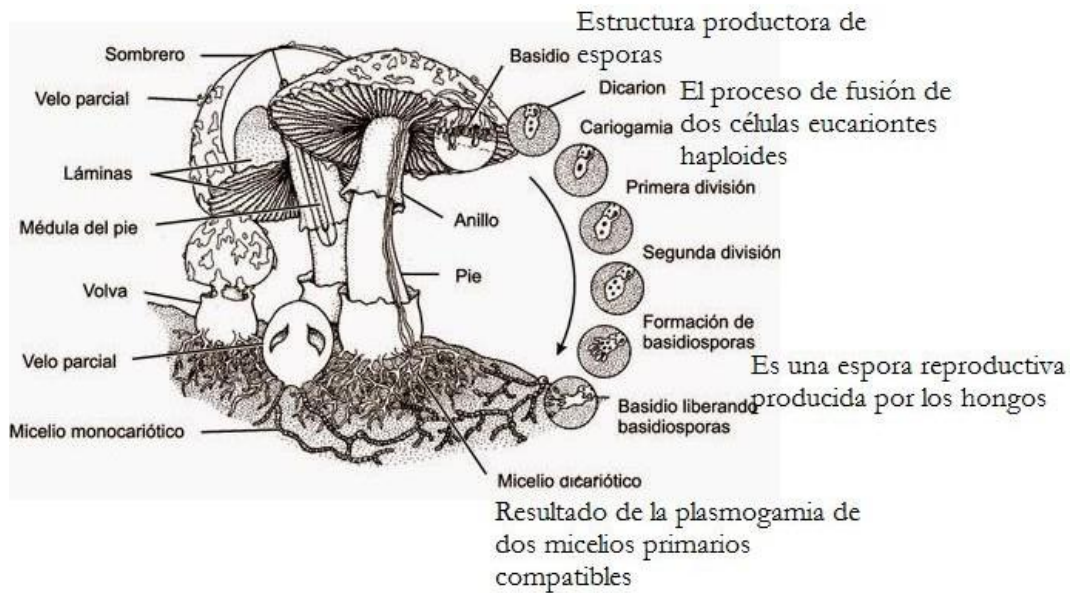


Ilustración 2 Ciclo de vida del hongo (Kuhar *et al.*, 2013).

Los hongos se reproducen por medio de esporas, la espora germina, surgiendo de ella una primera hifa, por cuya extensión y ramificación se va constituyendo un micelio (Sekan *et al.*, 2019).

Tabla 4 Compuestos aislados a partir del hongo comestible *Pleurotus* spp. y su eficacia contra diferentes grupos taxonómicos de helmintos (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017).

Especie	Compuesto nematocida	Nematodo (genero/especie)	Eficacia
<i>P. ostreatus</i>		<i>Heterodera schachtii</i>	
<i>P. febulae</i>	Cheimonophyllon E	<i>Bursaphelenchus xilophilus</i> ,	
	5-hydroxymethyl-furancarbaldehyde	<i>Panagrellus redivivus</i>	
<i>P. ostreatus</i>	Trans-2-decenedioic acid	<i>Panagrellus redivivus</i>	95%
<i>P. ostreatus</i>		<i>Meloidogyne arenaria</i>	87-94%
<i>P. eryngii</i>		<i>Syphacia obvelata</i> ,	95%
		<i>Hymenolepis nana</i>	89



Ilustración 3 *Pleurotus ostreatus*.

La palabra *Pleurotus* se deriva del griego “*pleuro*” significa formado lateralmente en referencia a la posición del pie respecto al sombrero y “*ostreatus*” en latín quiere decir en forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero también conocido con nombre común de hongo ostra, es uno de los hongos con mayor facilidad de cultivo, debido a su bajo costo económico, fácil adaptabilidad y productividad; México se posicionó como el mayor productor de hongos comestibles de latinoamérica, al generar el 80.8% de la producción para la región, seguido por Brasil 7.7% y Colombia 5.2%. A nivel mundial México se ubica en el décimo tercer lugar de los países productores de hongos comestibles. Entre las principales entidades productoras se encuentran Coahuila, Chiapas,

Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, y Veracruz. Cabe destacar que esta actividad tiene una importancia ecológica sin igual por la utilización y reciclaje de más de 500 mil toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Piña-Guzmán *et al.*, 2019). Es un hongo que se alimenta de la materia orgánica, y que degrada lignina, celulosa y hemicelulosa mediante complejos enzimáticos extracelulares, como las lacasas. Estas enzimas degradan la lignina que liberan al medio húmedo que les rodea, el agua es indispensable en la constitución de los hongos en proporción elevada, micelio 85% y esporas 45%. Dichos hongos crecen con facilidad sobre varios desechos forestales y agrícolas, tales como: aserrín, pulpa de madera, bagazo de caña de azúcar, desechos de café como asientos, etc. Dentro de este género, el más representativo y conocido es el *Pleurotus ostreatus* (Ravera *et al.*, 2008).

Respecto a la propiedad nematicida se ha notificado que 23 especies del género *Pleurotus* presentan esta actividad (Li y Zhang, 2014). Se ha observado que el hongo comestible *Coprinus comatus* produce estructuras esféricas espinosas que secretan nematotoxinas causando la inmovilización y daño morfológico sobre la cutícula del nematodo bacteriófago *Panagrellus redivivus* (Luo *et al.*, 2004, 2007). Asimismo, se ha notificado el aislamiento y caracterización de la estructura química de una nematotoxina llamada “NRRL 3526” del hongo comestible *P. ostreatus* con esta actividad en contra del nematodo *P. redivivus*, el cual inhibe en un 95% la población de nematodos a una concentración de 300 ppm en un tiempo de 1 h y se ha comparado la actividad con la “ostreanina” (Kwok *et al.*, 1992). Se estima que en el país existen cerca de 200 mil especies de hongos, pero sólo alrededor de ochomil son comestibles y con uso potencial en la medicina tradicional (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017).

El número de diferentes especies de hongos a nivel mundial se estima en 1.5

millones, de las cuales el 10% son conocidas, y de ellas el 50% se considera que son comestibles, más de 2000 son seguras, y unas 700 especies son conocidas por poseer importancia farmacológica (Lull *et al.*, 2005). A la fecha se han aislado diversos componentes con actividad nematocida como: alcaloides, quinonas, péptidos, terpenoides, ácidos grasos, polifenoles, entre otros (Li y Zhang, 2014) a partir de basidiomas de los hongos.

Sustrato agotado de los hongos comestibles, se ha notificado el uso como alimentos para animales y peces, ya que los basidiomas contiene una alta cantidad de proteínas. Las formulaciones que utilizan para la elaboración del sustrato incluyen diversos insumos como: pasto, cereales y granos y también se usan como componentes de las “dietas de los rumiantes”. Muchos hongos que se cultivan como alimento también se consideran alimentos funcionales. Con este nombre se incluyen productos potencialmente saludables, alimentos modificados, o con algún ingrediente que proporciona beneficios más allá de los nutricionales.

En la actualidad, varias especies del género *Pleurotus* tienen un alto valor comercial en el mercado mundial de hongos comestibles cultivados. La presencia de aminoácidos esenciales, como la arginina, la glutamina y el ácido glutámico, así como las vitaminas y los minerales, es característica de las especies de *Pleurotus*. El más popular entre ellos, *P. ostreatus*, es una tradicional seta comestible, altamente nutritiva con una composición dietética rica en nutrientes. Este hongo tiene un alto valor nutricional debido a su alta contenidos de proteínas, fibra y carbohidratos. Además de evidente importancia en el mundo. La agricultura y la industria alimentaria, los sustratos degradados también fueron considerados como un importante objeto para el propósito médico (Sekan *et al.*, 2019).

Debido al rápido crecimiento de la agroindustria y a la extensión de terrenos cultivados en algunas regiones agrícolas, la cantidad de materiales orgánicos de

desecho son una fuente de contaminación ambiental pues los grandes volúmenes generados rebasan la capacidad de biodegradación natural, de manera que estos desperdicios se pueden acumular llegando a convertirse en un riesgo para el equilibrio del ecosistema, ya sea porque son depositados en terrenos sin control alguno o bien quemados en el sitio generándose de esta manera contaminación ambiental. Por esta razón hay un interés creciente en la utilización de estos residuos en procesos productivos que permitan emplear estos materiales con los consecuentes beneficios económicos y ambientales.

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.

6. Justificación

Las enfermedades por nematodos gastrointestinales ocasionan una de las principales pérdidas económicas en el sector ganadero de México. El nematodo *H. contortus* presenta la mayor prevalencia a nivel mundial y nacional con un 37% en el abomaso, el uso inadecuado y frecuente de los productos químicos, ha dado origen al problema de la resistencia antihelmíntica. En el proceso final de producción de *Pleurotus* spp. el sustrato remanente después de la colonización y cosecha de los hongos es desechado, este subproducto es denominado sustrato degradado. Este material puede ser utilizado para relleno de suelos, en la preparación de compostas, como complemento en alimentación animal, entre varios otros usos. El estado de Chiapas es uno de los estados presenta la mayor actividad agrícola, en el que se genera anualmente toneladas de residuos agroindustriales ricos en biomasa lignocelulósica, y en la mayoría de los casos el aprovechamiento de residuos agroindustriales y sustrato degradado ha sido desestimado y no recibe ningún uso posterior por esta razón se buscan nuevas y mejores alternativas de aprovechamiento que hagan atractivo su reutilización, entre estas se encuentra el aprovechamiento de la carga enzimática remanente de *Pleurotus ostreatus*.

La información nutricional generalmente se explora en condiciones *in vivo*. En esa etapa tal vez la información nutricional sugiera que dicho candidato tenía una mala calidad nutricional. Por ello, proponemos evaluar *in vitro* la información nutricional de los tratamientos con mayor actividad antihelmíntica (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2018). Se debe incluir en la evaluación *in vitro*: Materia seca (MS) proteína cruda (PC) Cenizas (CEN) fibra cruda (FC) y extracto etéreo (EE).

7. Objetivo General

Evaluar *in vitro* el efecto letal en huevos y larvas de *H. contortus* de diez extractos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

7.1 Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el efecto letal en huevos de *H. contortus* de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.
2. Evaluar *in vitro* el efecto letal en larvas infectantes de *H. contortus* de diez extractos crudos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

8. Hipótesis

Los extractos crudos de las diferentes mezclas del sustrato degradado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* difieren en el efecto letal *in vitro* en huevos y larvas de *H. contortus*.

9. Material y métodos

Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*

Obtención de huevos *H. contortus*

Obtención de larvas infectantes de *H. contortus* (L₃)

Eliminación de la vaina de las larvas infectantes de *H. contortus*

Bioensayos y análisis estadístico
Análisis bromatológico

9.1 Localización

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM en Cuernavaca, Morelos; en el Laboratorio de Hongos Tropicales del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Sede Tapachula, Chiapas y en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del INIFAP, localizado en Jiutepec, Morelos, México.

Las mezclas de sustrato degradado del hongo *P. ostreatus* se obtuvieron del laboratorio de hongos tropicales del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR).

Tabla 5 Porcentajes de la composición de las diez Mezclas

Lote	Sustrato degradado		
	Composición de la mezcla (%)		
	<i>Zea mays</i>	<i>Digitaria eriantha</i> Steud	<i>Coffea canephora</i>
AT1	16.66	66.66	16.66
AT2	16.66	16.66	66.66
AT3	0	50	50
AT4	66.66	16.66	16.66
AT5	33.33	33.33	33.33
AT6	0	0	100
AT7	0	100	0
AT8	100	0	0

AT9	50	50	0
AT10	50	0	50

9.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*

Las muestras para realizar extractos hidroalcohólicos (70:30). Se pesaron individualmente cada sustrato 50 g, por medio de un embudo de plástico la muestra fue colocada en un matraz (Ilustración 6). Posteriormente se agregó una mezcla total de 0.5 metanol agua (70:30). Se dejaron por 24 h para extraer los metabolitos y posteriormente fueron filtrado. Se realizó una segunda extracción por 24 h más, el volumen fue concentrado y posteriormente las muestras fueron liofilizadas (Cuevas-Padilla *et al.*, 2018).



Ilustración 4 Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*

9.3 Obtención de huevos *H. contortus*

Se utilizó un ovino macho de raza Pelibuey de dos meses de edad el cual se encontraba en jaulas metabólicas en el CENID-SAI, INIFAP. El cual fue infectado vía oral con una dosis de 350 larvas infectantes por kg de peso vivo, después de 21 días del periodo pre- patente se recolectaron muestras fecales (Ilustración 7) directamente del recto (10 g aproximadamente)

Los 10 g recolectados directamente del recto del animal infectado, se tomaron 2 g para realizar la técnica de Mac máster con la finalidad de determinar cuántos huevos por g en heces hay en un animal, los cuales se mezclaron con 28 mL de solución salina hasta homogenizar, posteriormente se colocó una gasa como un colador y con una pipeta se recolectaron 1 mL de la solución para llenar la cámara de Mac máster.

Se realizó la lectura a 40x en un microscopio LEICA.

Para el cálculo de los huevos por gramos de heces se utilizó la siguiente formula:

HPG: Suma de huevos de los dos compartimientos x 50

La muestra posteriormente fue macerada y tamizada (Ilustración 8) a través de un sistema de mallas de diferentes aperturas: 35, 100, 200 y 400 utilizando agua (Liébano *et al.*, 2011).

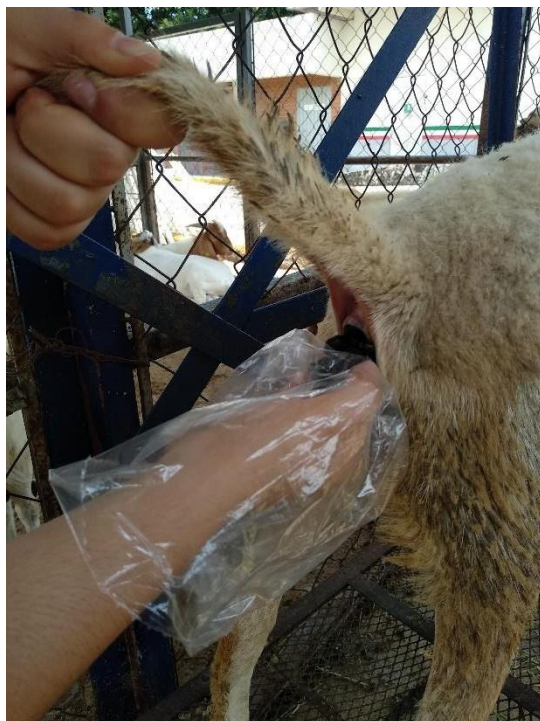


Ilustración 5 Obtención de muestra directamente del recto de ovino infectado.



Ilustración 6 Proceso de maceración y tamizado de la muestra para la obtención de huevos de *H. contortus*

Finalmente en un tubo de ensayo de 15 mL se agregó 8 mL de sacarosa al 40% y 6 mL de los huevos recuperados después del tamizado, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, esto con el fin de crear un gradiente de densidad y así poder recuperar los huevos que quedaron suspendidos en la fase con forma de anillo.

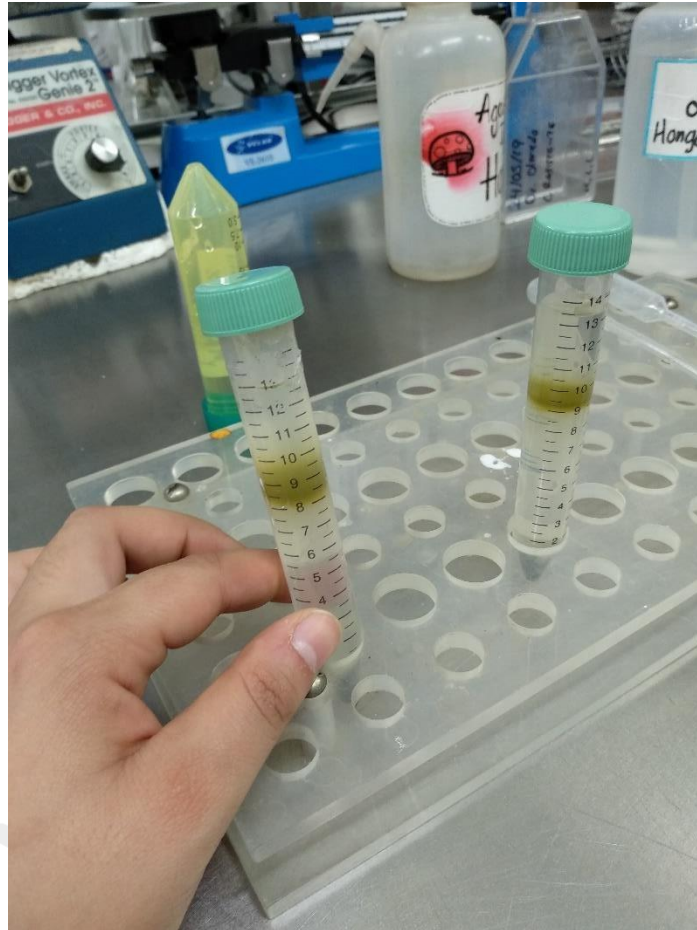


Ilustración 7 Proceso limpieza con sacarosa al 40%, gradiente de sacarosa para recuperar huevos en proceso de limpieza.

9.4 Obtención de larvas infectantes de *H. contortus* (L₃)

A los 21 días después de la infección se recolectaron las heces con ayuda de una palangana y se realizaron coprocultivos (Ilustración 10) en condiciones adecuadas para la obtención de larvas infectantes. Para el proceso del coprocultivo las heces se humedecieron con agua corriente y se mezclaron de manera homogénea con hule espuma a una proporción 1:1 aproximadamente, con el fin de obtener una humedad deseada (80 al 90% aproximadamente).

La temperatura que debe de tener es de 26-28°C. El pH óptimo para el desarrollo larvario debe de ser de 6.5 a 7.5 (Liébano, 2010).

Después de realizar esta mezcla se debe hacer una tapa con papel aluminio dejando una abertura en la parte de en medio que será sustituida por tela de gasa (20 x 20 cm aproximadamente) a manera de evitar la entrada de mosquitos e insectos que puedan contaminar la muestra, pero que permita la ventilación de la muestra. El coprocultivo se mantuvo en incubación durante siete días.



Ilustración 8 Proceso del coprocultivo para la obtención de larvas infectantes de *H. contortus*

Pasado el periodo de incubación se recuperaron las larvas por medio de la técnica del embudo de Baermann (Ilustración 11). Con un embudo se une por la parte inferior del embudo a un tubo de ensayo, una vez que se unieron se pone agua corriente hasta 1/3 partes del embudo. Pasado el tiempo de incubación del coprocultivo (7 días) se realizó la homogenización de la mezcla posteriormente tomando lo que cabe en el puño de la mano de heces se pone una por tela de gasa para obtener muñones de heces. Estos muñones se depositaron dentro de los embudos de Baermann y se agregó el agua corriente suficiente para cubrir el 75% aproximadamente del muñón de esta manera se dejó reposar durante 24 h, hasta obtener un sedimento con larvas infectantes en el fondo del tubo de ensayo y finalmente estas se almacenaron a 4°C hasta su uso (Liébano *et al.*, 2011).



Ilustración 9 Técnica del embudo de Baermann

9.5 Eliminación de la vaina de las larvas infectantes de *H. contortus*

Para la eliminación de la vaina de (L₃) de *H. contortus* (Ilustración 12) se utilizó hipoclorito de sodio comercial al 6% y se prepararon 10 mL a 0.187% donde fueron expuestas las larvas durante nueve minutos. Después se realizaron cuatro lavados con agua destilada, centrifugando durante 1 minuto a 3500 rpm para eliminar el hipoclorito de sodio. Una vez lavadas las larvas se recuperó el sedimento formado en tubos Falcón de 50 mL (Liébano-Hernández *et al.*, 2011).



Ilustración 10 Eliminación de la vaina

10. Bioensayos

10.1 Evaluación *in vitro* del efecto letal en huevos de *H. contortus* de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

Para la evaluación de la actividad nematicida de los extractos hidroalcohólicos

contra de huevos del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*, se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos. Por cada pozo se colocarán 50 µL de cada extracto y 50 µL de suspensión acuosa de huevos de *H. contortus*, obteniendo un volumen final de 100 µL y 100 huevos por cada pozo. Se incluyó un control negativo (PBS) y un control positivo (levamisol comercial a 5 mg/mL). Para cada tratamiento se realizarán 5 repeticiones a 6 concentraciones (0.315, 0.623, 1.25, 2.5, 5, 10). Se cubrieron las placas con papel aluminio y se incubaron a 28±1 °C. Posteriormente se realizó la lectura a las 72 h post confrontación. El porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos fue calculado mediante la siguiente fórmula (Pineda-Alegría *et al.*, 2017).

$$\% \text{ inhibición / mortalidad} = \frac{\text{testigo} - \text{tratado}}{\text{testigo}} \times 100$$

10.2 Evaluación *in vitro* del efecto letal en larvas de *H. contortus* de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

Para la evaluación de la actividad nematocida de los extractos hidroalcohólicos contra larvas infectantes sin vaina de *H. contortus* se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos. Por cada pozo se colocarán 50 µL de cada extracto a seis concentraciones y 50 µL de suspensión acuosa de huevos de *H. contortus*, obteniendo un volumen final de 100 µL y 100 huevos por cada pozo. Se incluyó un control negativo (agua destilada) y un control positivo (levamisol comercial a 5 mg/mL). Para cada tratamiento se realizarán 5 repeticiones. Se cubrieron las placas con papel aluminio y se incubaron a 28±1 °C. Posteriormente se realizó la lectura a las 48 hrs post confrontación. El porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos fue calculado mediante la siguiente fórmula (Cuevas-Padilla *et al.*, 2018).

$\% \text{ inibicion / mortalidad} = \frac{\text{testigo-tratado}}{\text{testigo}} \times 100$



Ilustración 11 Elaboración de bioensayos

11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics, se utilizó un análisis de varianzas con el modelo Anova (modelos lineales generalizados) y el método de la diferencia menos significativa (LSD) se obtuvo la concentración letal al 50 y 90 (CL_{50} y CL_{90}) mediante el PROBIT con el programa Poloplus.

12. Análisis bromatológico

En el análisis bromatológico se evaluó la información nutricional de los tratamientos con mejor actividad antihelmíntica de sustrato degradado en la etapa más temprana posible.

Se realizó el análisis bromatológico en AT5, AT2 y AT6 (Castañeda-Ramirez *et al* 2018). Se analizaron lo que es:

Materia seca (MS) Proteína cruda (PC) Cenizas (CEN) fibra cruda (FC) y Extracto etéreo (EE).

Se preparó una solución utilizando los respectivos extractos de acetona: agua a 5000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de PBS. Los controles negativos consistieron en L3 expuestos solo al PBS y los controles positivos consistieron en L3 expuestos a levamisol. Las concentraciones analizadas fueron 1200, 600, 200, 100 y 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de PBS. Cada concentración se agregó con 1000 μL de una solución conteniendo 1000 de L3 para obtener las concentraciones finales.

Las larvas L3 se incubaron por 3 horas a 24° C para después ser centrifugadas por 3 minutos para 3 lavados con PBS. Se colocaron alícuotas para cada solución de larvas en Eppendorf viales 200 μL cada uno para su lectura (Castañeda-Ramirez *et al* 2018).

13. Resultados

Respecto a la evaluación *in vitro* del efecto letal en larvas de *H. contortus* de los diez tratamientos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*, sometidos a los bioensayos a 72 h de exposición a seis diferentes concentraciones. Se demostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla 6), con base al análisis estadístico y al método de la diferencia menos significativa los grupos denotan diferencias o efectos altamente significativos (< P 0.05), el tratamiento AT5 notificó el mayor porcentaje de mortalidad al 79% a una concentración de 10 mg/mL, de la misma manera los tratamientos AT2 y AT6 presentaron un 77 y 73 % de mortalidad respectivamente. Sin embargo, el AT8 que notificó la menor mortalidad con un porcentaje de 35.7%.

Tabla 6 Evaluación del efecto letal en larvas de *H. contortus* de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

Tx	PBS	0.315 mg/mL	0.623 mg/mL	1.25 mg/mL	2.5mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	Levamisol
At1	7.83±1.52 ^a	15.81±1.52 ^b	15.74±1.52 ^b	20.63±1.52 ^c	22.09±1.52 ^c	42.35±1.52 ^d	57.18±1.52 ^e	100±1.52 ^f
At2	7.83±1.21 ^a	17.49±1.21 ^b	17.87±1.21 ^b	24.76±1.21 ^c	29.85±1.21 ^d	65.63±1.21 ^e	77.35±1.21 ^f	100±1.21 ^g
At3	6.17±2.11 ^a	20.60±2.11 ^b	19.71±2.11 ^b	21.17±2.11 ^b	32.81±2.11 ^c	54.92±2.11 ^d	48.13±2.11 ^e	100±2.11 ^f
At4	6.17±3.80 ^a	24.27±3.80 ^{ab}	16.98±3.80 ^{bc}	26.13±3.80 ^{bc}	31.06±3.80 ^c	45.64±3.80 ^d	66.34±3.80 ^e	100±3.80 ^f
At5	5.81±0.96 ^a	9.86±0.96 ^b	13.54±0.96 ^c	26.35±0.96 ^d	29.20±0.96 ^e	59.64±0.96 ^f	79.61±0.96 ^g	100±0.96 ^h
At6	2.87±1.28 ^a	14.79±1.28 ^b	16.55±1.28 ^b	24.94±1.28 ^c	31.66±1.28 ^d	59.92±1.28 ^e	73.12±1.28 ^f	100±1.28 ^g
At7	6.17±2.11 ^a	20.60±2.11 ^b	19.71±2.11 ^b	21.17±2.11 ^b	32.81±2.11 ^c	54.92±2.11 ^d	48.13±2.11 ^e	100±2.11 ^f
At8	7.37±1.38 ^a	11.34±1.38 ^a	16.46±1.38 ^b	20.16±1.38 ^{bc}	23.11±1.38 ^{cd}	24.71±1.38 ^d	35.70±1.38 ^e	100±1.38 ^f
At9	6.10±1.57 ^a	18.46±1.57 ^b	11.71±1.57 ^c	19.32±1.57 ^c	22.75±1.57 ^c	56.24±1.57 ^d	57.72±1.57 ^d	100±1.57 ^e
At10	6.10±2.66 ^a	17.45±2.66 ^{ab}	11.70±2.66 ^{bc}	24.00±2.66 ^c	34.37±2.66 ^d	62.38±2.66 ^e	63.13±2.66 ^e	100±2.66 ^f

Grupos/ denotan diferencias o efectos altamente significativos (< P 0.0001)

Todos los extractos crudos evaluados sometidos a los bioensayos a 48 h de exposición a 6 diferentes concentraciones (Tabla 7) tuvieron actividad inhibitoria contra huevos de *H. contortus*, con base al análisis estadístico y al método de la diferencia menos significativa los grupos denotan diferencias o efectos altamente significativos (< P 0.05) los tratamientos AT2, AT4, AT5, AT6 y AT7 notificaron el mayor porcentaje de inhibición entre 96-99% estos resultado de observaron a 10 mg/mL.

Tabla 7 Evaluación de la inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus* de diez extractos crudos de las diferentes mezclas de sustrato degradado de *P. ostreatus*.

Tx	PBS	0.315 mg/mL	0.623 mg/mL	1.25 mg/mL	2.5mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	Levamisol
At1	8.71±2.08 ^a	6.47±2.08 ^a	15.01±2.08 ^b	26.94±2.08 ^c	39.06±2.08 ^d	45.02±2.08 ^d	44.65±2.08 ^d	100±2.08 ^e
At2	8.71±3.99 ^a	37.12±3.99 ^b	56.39±3.99 ^c	90.49±3.99 ^d	98.58±3.99 ^d	96.36±3.99 ^d	98.90±3.99 ^d	100±3.99 ^d
At3	1.55±1.59 ^a	22.00±1.59 ^b	37.22±1.59 ^c	51.87±1.59 ^d	69.67±1.59 ^e	72.22±1.59 ^e	84.48±1.59 ^f	100±1.59 ^g
At4	3.52±2.19 ^a	17.69±2.19 ^b	29.84±2.19 ^c	60.99±2.19 ^d	70.13±2.19 ^e	77.87±2.19 ^f	97.66±2.19 ^g	100±2.19 ^g
At5	3.52±6.98 ^a	7.88±6.98 ^a	16.24±6.98 ^a	37.98±6.98 ^b	62.75±6.98 ^c	71.01±6.98 ^c	98.24±6.98 ^d	100±6.98 ^d
At6	10.71±2.02 ^a	64.31±2.02 ^b	60.42±2.02 ^b	98.25±2.02 ^d	96.74±2.02 ^d	74.74±2.02 ^c	98.98±2.02 ^d	100±2.02 ^d
At7	10.71±2.06 ^a	9.82±2.06 ^a	30.24±2.06 ^b	43.89±2.06 ^c	72.82±2.06 ^d	77.87±2.06 ^d	97.04±2.06 ^e	100±2.06 ^e
At8	5.78±2.04 ^a	6.73±2.04 ^a	17.15±2.04 ^b	32.80±2.04 ^c	36.34±2.04 ^d	67.93±2.04 ^d	79.65±2.04 ^e	100±2.04 ^e
At9	8.19±1.55 ^a	11.91±1.55 ^a	20.78±1.55 ^b	36.34±1.55 ^c	43.8±1.55 ^d	63.23±1.55 ^e	76.33±1.55 ^f	100±1.55 ^g
At10	1.68±1.74 ^a	8.04±1.74 ^b	14.93±1.74 ^c	22.55±1.74 ^d	26.42±1.74 ^d	61.28±1.74 ^e	66.82±1.74 ^f	100±1.74 ^g

Grupos/ denotan diferencias o efectos altamente significativos (< P 0.0001)

Los valores de la CL₅₀ y CL₉₀ sus intervalos de confianza al 95% fueron calculados a través del método PROBIT (Tabla 8), se observa que los tratamientos de mayor concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) en inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus*

es el tratamiento AT2-1123 comparable al tratamiento AT6 con un valor de 0.4 en CL₅₀ en un rango de 0.2-0.6.

Tabla 8 PROBIT de la inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus*

Tratamientos	CL₅₀	Límite inferior	Límite superior	CL₉₀	Límite inferior	Límite superior
AT1-1123	8.991	6.275	14.318	177.987	79.425	641.588
AT2-1123	0.46	0.272	0.654	1.782	1.265	2.901
AT3-1123	-	-	-	-	-	-
AT4-1123	-	-	-	-	-	-
AT5-1123	-	-	-	-	-	-
AT6-1123	0.198	0.006	0.587	4.54	1.811	40.671
AT7-1123	1.679	1.321	2.047	7.525	6.137	9.659
AT8-1123	-	-	-	-	-	-
AT9-1123	-	-	-	-	-	-
AT10-1123	-	-	-	-	-	-

Para el caso de la concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) en la evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas de *H. contortus* (Tabla 9) el tratamiento AT5-1123 fue el de mayor concentración letal (CL₅₀) con un valor de 4.4 µg en un rango de 3-5 µg.

Tabla 9 PROBIT de la mortalidad de larvas *H. contortus*

Tratamientos	CL₅₀	Límite inferior	Límite superior	CL₉₀	Límite inferior	Límite superior
AT1-1123	9.588	8.335	11.472	43.559	29.534	83.385
AT2-1123	8.991	6.275	14.318	177.987	79.425	641.588
AT3-1123	9.124	5.700	17.142	602.639	179.145	5250.561
AT4-1123	8.405	5.927	13.817	33.117	17.841	305.553
AT5-1123	4.468	3.912	5.019	18.232	14.816	24.285
AT6-1123	5.190	4.449	5.942	25.088	19.071	37.757
AT7-1123	-	-	-	-	-	-
AT8-1123	66.071	36.783	189.374	4545.087	931.596	122420.626
AT9-1123	7.520	6.072	9.716	34.163	21.778	78.197
AT10-1123	5.714	4.148	7.584	35.945	21.417	102.168

Con base a los resultados de los tratamientos con mayor actividad antihelmíntica, se muestra los resultados en cuestión de los rangos normales bromatológicos: Materia seca mayor del 90%, proteína cruda no más del 10%, fibra cruda 20-50%, cenizas menor del 5% (Tabla 10). Esto da como resultado un futuro prometedor para un producto nutracéutico (Ventura-Cordero *et al.*, 2017).

Tabla 10. Análisis bromatológico de los extractos de sustrato degradado de *P. ostreatus*

ID	Porcentajes				
	MS	PC	CEN	FC	EE
AT6-1123	91.87	8.05	7.33	43.82	0.71
AT5-1123	91.99	7.80	5.20	37.34	0.42
AT8-1123	93.85	4.14	2.20	30.28	0.0

Materia seca (MS), proteína cruda (PC), ceniza (CEN) fibra cruda (FC) extracto etéreo (EE)

13. Discusión

Los extractos crudos de *P. ostreatus* han sido evaluados previamente contra huevos del nematodo parásito *H. contortus* (Jasso-Díaz *et al.*, 2014). Li y Ziang. (2014) notificó 23 metabolitos secundarios con actividad nematocida en el hongo comestible *P. ostreatus*, de igual manera algunas proteasas, ácidos grasos, alcaloides, compuestos peptídicos, terpenos, taninos condensados y compuestos fenólicos (Li *et al.*, 2007; Ganeshpurkar *et al.*, 2012; André-Genier *et al.*, 2015; Pineda-Alegría *et al.*, 2020). De la misma manera el trabajo de Pineda-Alegría *et al* (2020) evaluaron

la mezcla de cuatro ácidos grasos y un β -sitosterol comerciales contra larvas L₃ de *Haemonchus contortus* sin vaina, donde la incubación de huevos de *H. contortus* en moléculas puras mostró un rango de inhibición del 25 % al 100 %; Así mismo, las diferentes combinaciones mostraron un rango de inhibición que va del 56 % al 100%.

Arteaga *et al.*, (2020) determinon el potencial nematicida y nematostático *in vitro* del micelio en agar agua y del filtrado del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medio Sabouraud sobre larvas J2 de *Globodera pallida*. Dando como resultado un efecto nematicida del filtrado a una concentración del 100 % y 24 horas de exposición, fue la más efectiva, con una tasa de mortalidad de larvas del 41,6 %.

Comans-Pérez *et al.*, (2021) evaluaron varias cepas de tres géneros de *Pleurotus*, entre esas cepas se encontraba una cepa de *P. ostreatus*, esto con la finalidad de determinar la actividad nematicida del micelio contra la larva L₃ de *H. contortus*. Como resultado, la cepa que mostró mayor actividad fue *P. ostreatus* con un 81.6% de mortalidad.

En este trabajo se evaluaron 10 extractos crudos de sustrato degradado en contra de huevos y larvas en estadio infectante del nematodo *H. contortus*. Donde se realizaron cinco repeticiones a seis concentraciones con exposición de 48 h contra huevos, a diferencia de las 72 h contra larvas infectantes. Los resultados obtenidos muestran que todos los tratamientos tienen una actividad nematicida. El mayor porcentaje obtenido fue en inhibición de eclosión de huevos, esto sugiere que la utilización del sustrato degradado tiene un mayor efecto contra estadio tempranos de *H. contortus*. Esto con base a otro estudio de Valdez-Uriostegui (2015), donde se evaluaron los extractos de cuerpos fructíferos, micelio y sustrato agotado del

hongo *P. ostreatus* contra de larvas y huevos de *H. contortus*. Los resultados mostraron que los extractos obtenidos de los cuerpos fructíferos y del micelio presentan un porcentaje de mortalidad de 82.7% y 96.8%, respectivamente, a las 72 h, a una concentración de 240 mg/mL, mientras que el extracto de sustrato agotado no presentó actividad significativa en contra de larvas L₃. Por otra parte, los extractos de micelio evaluados contra huevos presentaron un porcentaje de inhibición de 90%-100% en todas las concentraciones evaluadas, a las 48 h y 72 h. Con respecto al extracto de sustrato agotado, se reportó 100% de inhibición de la eclosión, a las 72 h, a 3.2 mg/mL.

Con la referencia de los insumos y composición de las mezclas del sustrato degradado los tratamientos con mayor porcentaje de mortalidad de larvas e inhibición de eclosión de huevos son los que poseen un mayor porcentaje (>20) de *Coffea canephora* y los de menor actividad antihelmíntica fueron los que poseen menor porcentaje (<20).

Existen reportes que el extracto hidroalcohólico de pulpa de café presenta actividad antihelmíntica debido a un grupo de compuestos de naturaleza fenólica (López-Rodríguez, 2020).

El análisis bromatológico propuesto demostró ser útil para la evaluación integral del potencial nutracéutico de los tratamientos con mayor actividad antihelmíntica ya que aparte de demostrar ser un alternativa para el control de nematodos, también se demostró que pueden ser comestibles y con alto valor nutricional para en un futuro hacer un estudio *in vivo*.

14. Conclusión

Existen diversos estudios sobre la actividad nematocida del hongo comestible *P. ostreatus* entre ellos hablan sobre la utilización del sustrato degradado el cual normalmente se desecha. Este estudio demostró una forma de utilizar al sustrato degradado de una forma productiva ya que éste posee un efecto nematocida contra larvas L₃ y huevos de *H. contortus*, este efecto había sido previamente reportado en diferentes estudios pero a diferencia de otros estudios, el porcentaje de la composición de la mezcla de los tratamientos (pulpa de café) demostró un impacto significativo en los resultados de las 10 mezclas evaluadas. En el presente trabajo se identificaron 2 tratamientos con una alto porcentaje de mortalidad de larvas e inhibición de eclosión de huevos.

El análisis bromatológico propuesto demostró ser útil para la evaluación integral del potencial nutraceutico de los tratamientos con mayor actividad antihelmintica ya que aparte de demostrar ser un alternativa para el control de nematodos, también se demostró que pueden ser comestibles y con alto valor nutricional para en un futuro hacer un estudio *in vivo*.

Los resultados exitosos podrían convertir al sustrato degradado de *P. ostreatus* como una fuente potencial de metabolitos y un método alternativo para el biocontrol de *H. contortus* en el área pecuaria.

15. Literatura citada

Aguilar-Marcelino, L., Sánchez-Vázquez JE., 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, 297-309.

André-Genier, H., Freitas-Soares EF., Queiroz JH., Gouveia ADS Araújo JV., Braga FR., Rebouças-Pinheiro I., Kasuya MCM. 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. Afri. J. Biotechnol. 14:1496-1503.

Arteaga, MB., Soria CA., Ordoñez ME. 2020. Determinación del potencial nematocida y nematostático *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*. Revista ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas. 41: 45-50

Byron, A., Hernández F., Castro EG., Cubides JA. 2018. 20 años de investigación en nematodos gastrointestinales de rumiantes. Conexión Agropecuaria, 8, 352-355.

Campos, RR. 2016. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. Revista técnica pecuaria en México, 28, 30-34.

Castañeda-Ramírez, G.S., Rodríguez-Labastida M., Ortiz-Ocampo GI., González-Pech PG., Ventura-Cordero J., Borges-Argáez R., Torres-Acosta JF., Sandoval-Castro CA., Mathieu-Demazière C. 2018. An *in vitro* approach to evaluate the nutraceutical value of plant foliage against *Haemonchus contortus*. Parasitology Research. 12: 3979-3991.

Chang, S.T., Miles, P.G. 1992. Mushroom biology a new discipline. *Journal of Mycologist*, 6, 64-65.

Comans-Perez, R.J., Sanchez JE., TawfeeqAl-Ani LK.,Gonzalez-Cortazar M., Castañeda-Ramirez GS., Mendoza-de-Gives P., Sanchez-Garcia AD., Millan-Orozco J., Aguilar-Marcelino L. 2021. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biologica control*. 152: 1-8.

Cuevas-Padilla EJ., Aguilar-Marcelino L., Sánchez JE., González-Cortázar M., Zamilpa-Álvarez A., Huicochea-Medina M., López-Arellano ME., 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 an 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, 193-211.

Elgorashi, E.E., Maekawa N., Satoh H. 2008. In vitro anti-inflammatory activity of selected Japanese higher Basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10:49-53.

Encalada-Mena, L., Tuyub-Solis H., Ramírez-Vargas G., Mendoza-de-Gives P., Aguilar-Marcelino L., López-Arellano M.E. 2014. Phenotypic and genotypic characterization of *Haemonchus* spp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 205, 246-54.

Fazaeli, H., Talebian-Masoodi R. 2006. Spent wheat straw compost of *Agaricus bisporus* mushroom as ruminant feed. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19, 845–851

Ganeshpurkar, A., Bhadoriya S.S., Pardhi P., Rai G., 2012. Investigation of anthelmintic potential of oyster mushroom *Pleurotus florida*. Indian J. Pharmacol. 44: 539-540.

González-Garduño, R., Cordova PC., Torres HG., Mendoza-de-Gives P., Arece GJ. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. Veterinaria México, 42, 125-135.

Haemonchosis. In: (2008). Mehlhorn H. (eds) Encyclopedia of Parasitology. Springer, Berlin, Heidelberg, 1703-1737.

Jasso-Díaz, G., Mendoza DGP., Torres HG., López AME., Aguilar ML., Ramírez BJE., Sánchez AH. 2014. *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mycelia bio-molecules. En A. Flisser (Presidencia), Ancient parasites, old hosts, new knowledge speaks for itself. Presentado en XIIIth International Congress of Parasitology, Mexico City.

Kim, MK., Hong HG., Park JA., Kang SK., Choi YJ. 2011. Recycling of fermented sawdustbased oyster mushroom spent substrate as a feed supplement for postweaning calves. (Report). Asian–Australasian Journal of Animal Sciences, 24, 493–499.

Kuhar, F., Castiglia V., Papinutt L. 2013. Reino Fungi: morfologías y estructuras del hongo. Boletín biológico, 28, 11-18.

Li, GH., Wang XB, Zheng LJ., Li L., Huang R., Zhang KQ. 2007. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. Ann Microbiol. 57:527-529.

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

Liébano-H, E., López A., Mendoza-de-Gives P., Aguilar-Marcelino L. 2011. Manual de diagnóstico para la identificación de larvas gastrointestinales en rumiantes. Publicación, 2, 1-48.

Liébano, HE. 2010. Cultivo e identificación larvaria de nematodos del tracto gastroentérico. Bautista GCR y López AME editores. Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Primera edición. INIFAP, 43-85.

Liébano-Hernández, E., López-Arellano ME., Mendoza-de-Gives P., Aguilar-Marcelino L. 2011. Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Manual, 2, 1-48.

López-Rodríguez, GI. 2020. Encapsulación de compuestos presentes en el extracto de pulpa de café usando como material de pared almidón modificado de malanga y evaluación de su actividad antihelmíntica.(Tesis posgrado) Universidad del Papaloapan Oaxaca, México. 1-16.

Lull, C., Wichers JH., Savelkoul FHJ. 2005. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Journal Hindawi Publishing Corporation, 2, 63-80.

Jean-Pierre, L., Martinez M. 2005. El impacto de productos veterinarios sobre insectos coprófagos: Consecuencias sobre la degradación del estiércol en pastizales. Acta Zoológica Mexicana, 3, 137-148.

Luo, H., Liu Y., Fang L., Li X., Tang N., Zhang K. 2007. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. Applied and Environment Microbiology, 73, 3916-3923.

Luo, H., Mo M., Huang X., Zhang K. 2004. *Coprinus comatus*: A basidiomicetes fungus forms novel spiny structures and infects nematode. *Micología*, 96, 1218-1225.

Marín-Castro, MA., Ramos-Cassellis ME., Calderón AA., Ticante-Roldán JA. 2018. Tecnología limpia y sustentable para el cultivo del hongo *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de ciencias*, 5, 35-43.

Gayosso-Canales M. 2001. Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce su fructificación. (Tesis para maestría) Universidad de Colima, México. 1-73

Martínez, MI., Cruz RM. 2009. The use of agricultura and livestock chemical products in the cattle-ranching area of Xico, central Veracruz México, and their possible environmental impact. *Acta Zoológica Mexicana*, 25, 637-681.

Mendoza-de-Gives, P., Valero-Cross RO. 2009. Uso de hongos nematofagos: una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado. Folleto técnico 7 Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, 1-34.

Munguía-Xóchihua, J., Navarro-Grave R., Hernández-Chávez J. 2018. Parásitos gastroentéricos, población *Haemonchus contortus* en caprinos en clima semiárido de Bacum, Sonora, México. *Abanico Veterinario*, 3, 42-50.

Rivero, N., Jaramillo A., Peláez A. 2019. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*). *Abanico veterinario*, 9, 13-22.

Orihuela, A., Vázquez-Prats V. 2009. Estrategias conductuales en la relación parásito-hospedero. *Técnica Pecuaria en México*, 46, 259-285.

Ortiz-Ocampo, GI., Chan-Pérez JI., Covarrubias-Cárdenas AG., Santos-Ricalde RH., Sandoval-Castro CA. 2016. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic effect of *Coffea arabica* Residues against an *Haemonchus contortus* isolate with low susceptibility to tannins. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19, 41-50.

Ovando, RG. 2018. Cultivo y Elaboración de productos a base de setas (Tesis de licenciatura). Universidad de ciencias y artes Chiapas, 1-62.

Medina, P., Guevara F., 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, 257-263.

Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández A., Carrasco- Hernández V., Yescas-Pérez A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de Posgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México, 167-168.

Pérez-Cogollo, LC., Rodríguez-Vivas RL., Basto-Estrella GS., Reyes-Novelo E., Martínez-Morales I., Ojeda-Chi MM., Favila ME. 2018. Toxicidad y efectos adversos de las lactonas macrocíclicas sobre los escarabajos estercoleros: una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, 1293 -1314.

Pineda-Alegría, JA., Sánchez JE., González-Cortázar M., Zamilpa A., López-Arellano ME., Cuevas-Padilla EJ. 2017. The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 20, 1184-1192.

Pineda-Alegría JA., Sánchez JE., González-Cortázar 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: 135, 1–4.

Piña-Guzmán, AB., Nieto-Monteros DA., Robles-Martínez F. 2019. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo del hongo comestible seta (*Pleurotus* spp.) Revista internacional de contaminación ambiental, 32, 141-151.

Quimio, T.H. 2002. Preparación de semilla. En: Sánchez-Vázquez, J.E., D.J. Royse (Eds.). La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp. El Colegio de la Frontera Sur/ Ed. Limusa, S.A. de C.V. México, 141-156.

Quintero, EZJ. 2018. Evaluación *in vitro* y en microparcels del ácaro nematófago *Caloglyphus mycophagus* con uso potencial contra tres nematodos de importancia agropecuaria (Tesis de licenciatura). Instituto tecnológico superior de san miguel el grande, 1-80.

Ravera, C., Bettera C. 2008. Aprovechamiento de los residuos agrícolas. Procesamiento de la caja del maní, su conversión biológica y productos Argentina, 28, 4-5.

Rodríguez-Gómez, A. 2016. Actividad ovicida y larvicida *in vitro* del extracto hidro-alcoholico de *Acacia cochliacantha* en *Haemonchus contortus* (Tesis para licenciatura) Universidad autónoma de México, 1-51.

Rodríguez-Vargas, CF. 2006. Control de Haemonchosis en caprinos. Agronomía mesoamericana, 17, 79-88.

Rodríguez, GE., Martínez DaA., Buglione MB., Filippi MV., Agüero MS. 2018. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado. *Anales de biología*, 40, 21-30.

Sánchez, JE., Mata G. 2012. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. México: El Colegio de la Frontera Sur, 207-216.

Sánchez-López, L. 2012. Evaluación de la suplementación alimenticia y un antihelmíntico sobre la endoparasitosis en cría Boer. (Tesis de licenciatura) Universidad agraria Coahuila, México, 1-56.

Sánchez, JE., Royse DJ. 2017. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur, 347-352

Sánchez, J., Andrade-Gallegos L., Moreno-Ruiz R., Camacho L. 2016. Aportaciones de Ecosur al conocimiento de macromicetos y al desarrollo de tecnología para su cultivo y aprovechamiento, 258-301

Sekan, AS., Myronycheva OS., Karlsson O., Gryganskyi AP., Blume Y. 2019. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. *National library of medicine*, 7, 1-27.

Shnyreva, AV., Shnyreva AA., Espinoza C., Padrón JM., Trigos Á. 2018. Antiproliferative Activity and Cytotoxicity of Some Medicinal Wood-Destroying Mushrooms from Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20, 1– 11.

Valdez-Uriostegui, L.V. 2015. Evaluación *in vitro* de extractos del micelio, fruto y sustrato agotado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, contra huevos y larvas del

nematodo parásito de ovinos *Haemonchus contortus* (L₃). Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Morelos, México. pp.1-94.

Ventura-Cordero, J., González-Pech PG., Jaimez.Rodriguez PR., Ortíz-Ocampo GI., Sandoval-Castro CA., Torres-Acosta JFJ. 2017. Gastrointestinal nematode infection does not affect selection of tropical foliage by goats in a cafeteria trial. *Animal Health*, 49, 97-104.

Von son de Fernex, E., Diaz A., Mendoza-de-Gives, P., Valles de la Mora B., Liébano-Hernandez E., Arellano-López ME. Aguilar-Marcelino L. 2014. Reappearance of *Mecistocirrus digitatus* in cattle from the Mexican tropics: prevalence, molecular and scanning electron microscopy identification. *The Journal of Parasitology*, 100, 296-301.

Widiarso-Purwo, B., Kurniasih K., Prastowo J., Nurcahyo W. 2018. Morphology and morphometry of *Haemonchus contortus* exposed to *Gigantochloa apus* crude aqueous extract. *veterinary world* , 11, 921-925.

Zaragoza, A., Rodríguez E. 2019. Cassia fistula como tratamiento alternativo contra nematodos gastrointestinales de ovino. *Abanico Veterinario*, 9, 1-8.

Páginas electrónicas consultadas

<https://www.conacyt.gob.mx/index.php/el-conacyt/resultados-de-las-convocatorias/16774-resultados-de-pertinencia-apn2017-1/file>.

Dildo Márquez Lara. 2013. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. ENGORMIX Sitio web: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/resistencia-antihelminticos-origen-desarrollo-t29960.htm>

Gasque Ramón. (2008). Enciclopedia Bovina. México, UNAM.

Cronograma de actividades (2019-2021)

Actividades	1° Semestre	2° Semestre	3° Semestre	4° Semestre
Materias	x	x	x	
Examen de ingles		x		
Revision literartura	x	x	x	x
Redaccion del escrito	x	x	x	x
Redaccion del articulo cientifico			x	
congresos		x		x
Objetivo especifico 1 y 2		x		
Objetivo especifico 3		x	x	

Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus***”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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 INIFAP

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

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2021-05-07 12:05:36 | Firmante

E36RVJ+yK9ZoE9YWiHmSvB1DH5c3h9GnL3e8fhof1b4KaqnkkbUSxtlB7nM5hYsYHqZTt+h0Nv09I8sNtskuQDG6FzIL5FWfei00BK6Sv9sW9IG5YQqm+GyPkXKMySmPfkZ9mn4y19mDFMHO3ked7motAyExEcSrI9mVYi3onmpnZgDLqInJ86EPcHpApmdcDFIG2YM3CZ1o4bPKq7ew5paxZlpg8C6vxhwcYR2+wcF0vJEI8rVtalenI5uSoOPVEFsDCB/oTIIl71mDoIGEHNyiVomPHxJAEntszEA9FWq0PfePxDIPLXCjSmwiWHB2x+JrvlmpTeyv1BI0VfcPAg==

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



dcaUxG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GVJsY1AGpig5rBF6m2bWPa4eo66POQUs>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus***”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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:2021-05-07 19:57:14 | Firmante

Vo0eU/bWpw6Oz11xAyBhN7i+r8T4kZJNMewtQIVKo8bDkvKCRuuMGpGuhKPHKSp+IsDz3WCWC7Ht3NH7Hai7bBXtdczA5ouMiktj7GrcMARdT3CoTnBgVHKXC1DCq2Shgck0b/7Q2dUffirmpd8xAk8hXTJO9ihhu5Hct0vu/+E6F673u7MnBgMY+uDCSL3c1Irb2xDexweOovxBBiCNJyUK/nM5Dj3LI7/llwXitbrE3NVwfO7i2bjaQE71QYTviajBYfPuiq/XXJQai1Qu tKI5ejDZne0Go423U1AM2g1RvrxBnxa8S07eTAT09ZeQdZilgdbp86lsJURH3IE7alg==

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



[Z0VUgA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/K0z3sZe5XnBXxTO4cXhA7iT8yM9cwpRY>

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

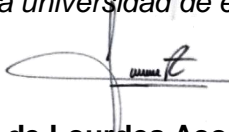
Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus***”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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:2021-05-09 15:52:01 | Firmante

KBcHCJHqwmLu9hftyPnyT55Zjno8CLmNv89lzl+VVRvnlBuWq3w6XBkuccSZfkRh4SH1ojmeE4wsbCX8eYOjjv8YJMf5NHt/98K9iBb30e32q+0s9wwwvx68OKhHxo8W5hRHLef7t5Tg69lzSVcwLcDd8VbD+HDS5BaB1MDdO5PLUUyxqiOnKTZM6s2fXcRIIFPzT2ubvV2U0zDUhCsn0ppsz5Z76gjt07Yey4CLmV7L/E2Jph+lwkQrHNSdsqk0PBzHB/hr8ZAL4qKQMk71Z6Sr3UUNv2GnnyLyTnLcirVTOVRzc4WngV69QquWz5vAwPaupif5o6RMwVwxR1Lg==

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



MwFl2q

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XydUNh3juwOPsoEOAz3zWmU11t76UDSbc>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus*”**”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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:2021-05-09 16:30:50 | Firmante

TVv5xZvpqBUyICiYQl3ykXGA25ffA7aHP0baReff/QqwuwgjBQgyQi7HzU8eJpDzeHbIF3JlfyyExiv53BSLf+wfBb9fEyhgLxAlxHxtqzQr+hFjYDehCP6cMQxDPUABhCoSP1eBmUDE
OIHjw8h22HEM2nGCFpymwM0pdUx7/C4IYcVrf0KCeJDsFlpk02OmUubVdY7nQ26xtAflieVd8WHFY1taf7R47hgh2W4mYtcv8Gdq8Mi2HXxojcSdLw5OEM8uZpXHGkE5mc98W
x+WAGMRdQRJpVm76ayaWS55+wO/RIWI+mjvOzKvrOviCa3VdUSJ2dSyjBzf1o9OwnQ==

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



AY1R7p

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wVYC8MEfR18TWANYGpJKrxrfzI8NB2IB>



Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus***”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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. Edgar Martínez Fernández
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

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2021-05-12 11:53:29 | Firmante

CVkPxeX48FXoLHrgci+wbXNd7+je9xCNKfp2F1xvOv0VfCrtL7/Htj9n7mFO/t29HmJo7JvsZQ4lndio3Wpun82EtESoknHSrfPtRhi+ufXLvvpfx8AlgGJISdBYQz/9viBk+iZTRFiVxjWnBE11AiuwcMqRQHgzivWxDKu5IL4JGpC+T/VIRcToKC+DkK79EdX30bjpdZ8Zmt+XiinBMe8TFhmF3sdMTN5cUx3/RBzFeEC/oJZ4KCK8OGVegZzeeK3ws4J7T5UMA3nREoGLhW1DjRCiXMzdmvNTpzzL8b5GWxLNYlhZ9nRCg4z+b1OdZHrhfeA121P4INOITM8w==

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



D9I3jp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1dyw4gr22DMWPhS2oJp7Pueh535HnX5j>





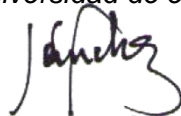
Cuernavaca, Mor., a 05 de mayo de 2021

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: “**Evaluación in vitro del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus***”, que presenta la alumna **TANIA MARIA RODRÍGUEZ BARRERA**, 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. José Ernesto Sánchez Vázquez
Profesor Investigador UAEM

C.c.p. archivo