



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS



---

---

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

“ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS  
ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus*  
*djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN MANEJO  
DE  
RECURSOS NATURALES:  
PRESENTA

IBT. María Victoria Benavides Aguilar

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

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

CUERNAVACA, MORELOS

Junio, 2025

**Ciencia y  
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS



---

---

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

“ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS  
ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus*  
*djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN MANEJO  
DE  
RECURSOS NATURALES:  
PRESENTA

IBT. María Victoria Benavides Aguilar

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

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

CUERNAVACA, MORELOS

Junio, 2025

**Ciencia y  
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación



## AGRADECIMIENTOS

Al CENID-SAI del INIFAP por todo el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al SECIHTI por el financiamiento otorgado al proyecto CBF2023-2024-387 y por la beca 1227151.

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino y Dra. Maura Téllez Téllez por la dirección del presente trabajo de investigación, su confianza y amistad brindadas.

Al Dr. Alejandro García Flores por sus valiosos comentarios que ayudaron en el presente trabajo.

Al Dr. Manases Gonzáles Cortazar, por todo su apoyo para la obtención de metabolitos y su análisis cromatográficos.

Al Dr. José E. Sánchez de la Unidad Tapachula del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) por su apoyo en la elaboración de los sustratos degradados para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Gloria Sarahi Castañeda Ramírez por sus atinados comentarios, sugerencias, revisiones, y conocimientos compartidos.

A los maestros de la CIB-UAEM, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, que hicieron posible mi desarrollo profesional en esta etapa de mi vida.

A la Dra. Lourdes Acosta Urdapilleta, y al Dr. Guadalupe Peña Chora por las revisiones, comentarios y sugerencias valiosas para el presente trabajo.

A todos aquéllos (as) que de una u otra manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

A *many* por darme ánimo en todo momento.

## DEDICATORIA

Dedico especialmente este trabajo de Tesis a mi Rey ELOHIM, por guiarme,  
sostenerme, dirigirme, nadie como tú; de ti recibo siempre la ayuda

*Den gracias al Señor Elohim, porque él es bueno; su gran amor perdura para siempre.*

"Todáh Rabáh"

## ÌNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>2 MARCO TEÓRICO</b>	5
2.1 Hemoncosis en ovinos	5
2.2 Aspecto morfológico de <i>H. contortus</i>	6
2.3 Ciclo biológico de <i>H. contortus</i>	10
2.4 Control tradicional de <i>H. contortus</i>	14
2.5 Resistencia antihelmíntica de los NGI	16
2.6 Mecanismos de acción de antihelmínticos químicos	16
2.7 Hongos comestibles como alternativa de control de NGI	20
2.7.1 Ciclo biológico de los hongos	24
2.8 Sustratos lignocelulósicos para el cultivo de hongos comestibles	25
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4. OBJETIVOS</b>	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
<b>5. HIPÓTESIS</b>	31
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
6.1 Esquema general de trabajo	32
6.2 Localización	33
6.3 Obtención de larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	35
6.3.1 Eliminación de la vaina de las larvas L <sub>3</sub>	35
6.4 Obtención de extractos etanólicos del SD de <i>P. djamor</i> y sustrato estéril sin micelio, de T2 y T5	35

6.5	Obtención de fracciones por bipartición de los extractos etanólicos	40
6.5.1	Confrontación <i>in vitro</i> para evaluar el efecto nematocida de los extractos etanólicos concentrados y las fracciones, de los SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5, mediante el porcentaje de mortalidad de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	41
6.6	Curva de concentración para evaluar el efecto nematocida de los extractos etanólicos concentrados y de las fracciones de acetato de etilo y del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 contra L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	44
6.7	Fraccionamiento micoquímico-biodirigido de la fracción de acetato de etilo de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2	47
6.7.1	Confrontación <i>in vitro</i> para evaluar el efecto nematocida de las reuniones obtenidas de las fracciones de SDT2-AEC de <i>P. djamor</i> y SEsmT2-AEC mediante el porcentaje de mortalidad de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	48
6.8	Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) de las reuniones de mayor efecto nematocida del SDT2-AEC de <i>P. djamor</i> y SEsmT2-AEC contra L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	49
6.9	Análisis estadístico	50
7.	<b>RESULTADOS</b>	51
7.1	Rendimientos de extracción de los extractos etanólicos concentrados obtenidos por maceración del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5	51
7.2.	Rendimientos de extracción de las fracciones del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5, obtenidas por bipartición a partir de los extractos etanólicos concentrados	51
7.3	Evaluación de la solubilidad de los extractos etanólicos concentrados y de las fracciones del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5	53
7.4	Efecto de las fracciones de los extractos etanólicos concentrados de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5, en los porcentajes de mortalidad de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	56

7.4.1	Confrontación <i>in vitro</i> de las fracciones con mayor efecto nematocida de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm y sus respectivos blancos, contra larvas L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	58
7.5	Porcentaje de mortalidad <i>in vitro</i> de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> a diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm de T2	61
7.6	Reuniones y perfiles cromatográficos obtenidos del estudio micoquímico y biodirigido de la fracción de acetato de etilo de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2	63
7.6.1	Porcentaje de mortalidad <i>in vitro</i> de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> de las reuniones obtenidas por CPF de SDT2-AEC de <i>P. djamor</i> y SEsmT2-AEC	66
7.7	Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de las reuniones de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2-AE CR que mostraron alta actividad nematocida contra L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	68
7.8	Estimación de la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> y CE <sub>90</sub> ) de SDT2-AE de <i>P. djamor</i> y SEsmT2-AE contra L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>	86
8.	<b>DISCUSIÓN</b>	89
9.	<b>CONCLUSIONES</b>	101
10.	<b>PERSPECTIVAS DEL TRABAJO</b>	102
11.	<b>LITERATURA CITADA</b>	103
12.	<b>DICTIOGRAFÍA</b>	123

---

## RESUMEN

En las parasitosis en ovinos ocasionadas por *Haemonchus contortus*, representa del 80-90%, el sustrato degradado (SD) de *Pleurotus* spp. ha demostrado actividad nematicida (AN) por lo que se ha reportado como estrategia de control. El objetivo fue evaluar el porcentaje de mortalidad de larvas L<sub>3</sub> (%ML<sub>3</sub>) de *H. contortus* de dos extractos orgánicos (T2 y T5) de SD de *P. djamora* e identificar compuestos con AN mediante CG-EM. Todos los extractos se obtuvieron bajo las mismas condiciones [T2; T5 y SD de *P. djamora* (SDPd)], extractos etanólicos (EE) y por bipartición, las fracciones de hexano (H), acetato de etilo (AE), butanol (B) y acuosa (A), y sometieron a una confrontación *in vitro* (100 L<sub>3</sub> de *H. contortus* por pozo) e Ivermectina como control positivo para calcular el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. Se fraccionó mediante cromatografía en columna y las que presentaron mayor AN se analizaron por CG-EM. La fracción A de T2 del SDPd y del SEsm mostró el mayor rendimiento (12.3 g y 16.34 g, respectivamente); en T5 (SDPd) fue con AE (6.96 g) y el SEsm con H (7.31 g). El SDPd presentó %ML<sub>3</sub> del 28.25-90.25% (T2) y 41.75-79.50% (T5); mientras que en el SEsm, en T2 fue del 64.25-90.75% y del 43.50-71.0% en T5 (p<0.05). Las fracciones de H y AE de SDPd y SEsm, de T2 y T5, mostraron los mayores %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. Sin embargo, la fracción de AE-T2 del SDPd mostró la AN más alta (95.50±2.08) así como en el SEsm (92.25±2.21); al aumentar la concentración el %ML<sub>3</sub> se incrementó de 59.08±1.37-89.41±4.35% (SDPd) y de 46.83±2.03-96.91±3.0% (SEsm); a 20 mg mL<sup>-1</sup>, el SEsmT2-AE mostró mayor AN que el SDPd. De las reuniones obtenidas por CPF, la “R6” (SDPdT2-AE) mostró mayor AN (97±1.88), así como las “R3” y “R5” del SEsmT2-AE (96.40±1.57 y 96±1.39, respectivamente). Por CG-EM se identificaron compuestos de naturaleza fenólica y ácidos grasos, entre otros. Se concluyó que el SDPdT2-AE así como el SEsm a base de pulpa de café podría representar alternativas sustentables para el control de NGI en ovinos.

## ABSTRACT

Parasitosis in sheep caused by *Haemonchus contortus* represents 80-90% of the cases. Currently, it has been reported that the degraded substrate (DS) of *Pleurotus* spp. presents nematicidal activity (NA), making it an alternative for control. The objective was to evaluate the percentage of mortality of L3 larvae (%ML3) of *H. contortus* from two organic extracts (T2 and T5) of DS of *P. djamora* and to identify compounds with NA by GC-MS. All extracts were obtained under the same conditions [T2; T5 and SD of *P. djamora* (SDPd)], ethanolic extracts (EE) and by bipartition, the hexane (H), ethyl acetate (EA), butanol (B) and aqueous (A) fractions were subjected to an in vitro confrontation (100 L3 of *H. contortus* per well) and Ivermectin as a positive control to calculate the %ML3 of *H. contortus*. It was fractionated by column chromatography, and GC-MS analysed the fractions with the highest AN. Fraction A of T2 of SDPd and SEsm showed the highest yield (12.3 g and 16.34 g, respectively); in T5 (SDPd) it was with EA (6.96 g) and SEsm with H (7.31 g). The SDPd presented %ML3 of 28.25-90.25% (T2) and 41.75-79.50% (T5); while in the SEsm, it was 64.25-90.75% at T2 and 43.50-71.0% at T5 ( $p < 0.05$ ). The H and AE fractions of SDPd and SEsm, from T2 and T5, showed the highest %ML3 of *H. contortus*. However, the AE-T2 fraction of SDPd showed the highest NA ( $95.50 \pm 2.08$ ), as did the SEsm ( $92.25 \pm 2.21$ ); with increasing concentration, the %ML3 increased from  $59.08 \pm 1.37$ - $89.41 \pm 4.35\%$  (SDPd) and  $46.83 \pm 2.03$ - $96.91 \pm 3.0\%$  (SEsm); at 20 mg mL<sup>-1</sup>, the SEsmT2-AE showed higher NA than the SDPd. Of the bonds obtained by CPF, “R6” (SDPdT2-AECP) showed higher NA ( $97 \pm 1.88$ ), as did “R3” and “R5” of the SEsmT2-AECP ( $96.40 \pm 1.57$  and  $96 \pm 1.39$ , respectively). By GC-MS, compounds of phenolic nature and fatty acids, among others, were identified. It was concluded that SDPdT2-AE and coffee pulp-based SEsm could represent sustainable alternatives for the control of NGI in sheep.

## 1. INTRODUCCION

Los sistemas de producción en ovinos se basan en su mayoría en modelos "extensivos", es decir, pastoreo en áreas abiertas (Alunda *et al.*, 2013) lo que favorece enfermedades parasitarias, las cuales son una de las causas de baja productividad en el ganado ovino y de causar mortalidades entre 20-50% en regiones principalmente templadas-cálidas, tropicales y subtropicales del mundo (Waller y Emery *et al.*, 2016; Rinaldi *et al.*, 2015). Las parasitosis en pequeños rumiantes son ocasionadas por nematodos gastrointestinales (NGI), entre los cuales, el nematodo hematófago del abomaso *Haemonchus contortus*, representa del 80-90% (Cepeda-Martínez, 2017; Besier *et al.*, 2016a; Medina *et al.*, 2014). En México, el impacto económico derivado del parasitismo por NGI es de alrededor de \$ 35 000 000 000 (Treinta y cinco mil millones de pesos) por año (FAO 2020). Los métodos tradicionales de control de NGI consiste en antihelmínticos (AH) químicos; sin embargo, el uso irracional e inapropiado de estos productos ha generado problemas de resistencia antihelmíntica (RA) (Reyes-Guerrero *et al.*, 2021), aunado a los efectos tóxicos residuales en la población y el medio ambiente (López-Rodríguez *et al.*, 2022). Ante esta situación, se han planteado diferentes estrategias de control a partir de extractos de plantas medicinales (Rodríguez-Gómez, 2016; Torres-Acosta *et al.*, 2021), manejo de pastoreo, control biológico (Quintero-Elena *et al.*, 2022), vacunas como "Barbervax" derivada de antígenos de superficie del recubrimiento del intestino de nematodos (Reyes-Guerrero *et al.*, 2021), inmunización con larvas y agujas de cobre (Medina *et al.*, 2014). En este sentido, existen estudios que demuestran que hongos comestibles del género *Pleurotus*, poseen actividad nematicida (AN) y cestocida (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017); al respecto, Li y Zhang, (2014) reportaron 23 especies de *Pleurotus* con AN, relacionando dicha actividad con diversos metabolitos secundarios; particularmente, 84 que se han aislados de dicho género

a partir de micelio, basidiomas y sustrato degradado (SD) (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021). Otros autores mencionan que son alrededor de 200 compuestos tóxicos con AN que han sido encontrados en los hongos (Salmones *et al.*, 2020). El crecimiento de *Pleurotus* spp. se produce en sustratos lignocelulósicos de desechos agroindustriales como paja, aserrín, bagazo, residuos de café (*Coffea arabica* L.) y cáscara de semilla de algodón (*Gossypium* sp.) (Sánchez, 2010; Nieto y Chegwin, 2010). Durante la degradación del sustrato y después de la obtención de la primera y segunda cosecha de basidiomas, se genera un subproducto orgánico llamado sustrato degradado de *Pleurotus* (SDP) que consiste en micelio, fúngico, enzimas extracelulares, polisacáridos y biomasa lignocelulósica residual (Diamantopoulou y Philippoussis, 2015; Zhang *et al.*, 2016). En *P. djamor* existen datos de producción de la primera cosecha de basidiomas a partir de la segunda semana de incubación, debido a que presenta ciclos de cultivo más cortos en comparación con otras especies comerciales de *Pleurotus* (Salmones, 2017). Los hongos comestibles han adquirido gran importancia, no solo para consumo humano, sino por sus efectos terapéuticos y de salud funcional-nutricional (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016); además se han propuesto como una alternativa para el control de NGI; por ejemplo, algunos extractos de basidiomicetos se han evaluado *in vitro* con AN como *Agaricus blazei*, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *Lentinula edodes*, dicha actividad se ha relacionado con la presencia de metabolitos como ácidos grasos, taninos, terpenos y compuestos fenólicos (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el porcentaje de mortalidad de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* de dos extractos orgánicos (T2 y T5) de SD de *P. djamor* y comparar el efecto nematicida de los SD con los sustratos sin hongo, e identificar los compuestos con actividad nematicida, tanto en el SD como en el sustrato sin hongo mediante CG-EM, así como estimar la concentración efectiva (CE) mediante un análisis PROBIT.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Hemoncosis en ovinos

La hemoncosis en ovino es causada por el nematodo parásito *Haemonchus contortus* (Besier *et al.*, 2016a), uno de los NGI de mayor patogenicidad en la ovinocultura debido a sus hábitos de hematofagia, alta prolificidad y amplia distribución en regiones templadas-cálidas, tropicales y subtropicales del mundo (Selemon, 2018; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; Emery *et al.*, 2016; Besier *et al.*, 2016b); este parásito, también es el causante de las mayores pérdidas económicas en ovinos por lo que reduce su rentabilidad (Zapata *et al.*, 2016; Partida *et al.*, 2013; Soca *et al.*, 2005). La enfermedad de hemoncosis se clasifica como híper aguda, aguda o crónica (Cardona *et al.*, 2017; Rodríguez-Gómez, 2016) y provoca pérdida masiva de sangre y peso, gastritis hemorrágica, falta de apetito, disminución de la condición corporal, anemia, debilidad, anorexia, edemas de regiones bajas del cuerpo, diarrea, baja producción de leche, susceptibilidad a otras enfermedades y la muerte repentina en animales jóvenes infectados, la cual puede ocurrir de 4-6 semanas post-infección (Saccareau *et al.*, 2017; Cardona *et al.*, 2017; Besier *et al.*, 2016a). La infección comienza cuando los ovinos ingieren larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de NGI presentes en el pasto (Kumarasingha *et al.*, 2016; Balic *et al.*, 2002). La fase híper aguda por NGI, por ejemplo, puede ocurrir en la primera semana de infección con la muerte del animal sin la presencia de síntomas aparentes (Cepeda-Martínez, 2017). Los NGI como *H. contortus* son endoparásitos de cuerpo no segmentado, cilíndrico, simétrico, alargado, delgado, cubiertos por una cutícula compuesta por quitina y de proyección convergente en ambos extremos (Byron *et al.*, 2018; Widiarso-Purwo *et al.*, 2018; López *et al.*, 2013). Entre el huevo y el adulto, los nematodos pasan por cuatro estadios de larvas juveniles (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>) y una etapa pre-adulta (L<sub>5</sub>) hasta llegar a ser nematodos adultos (NA). La infección comienza cuando los ovinos ingieren L<sub>3</sub> de nematodos

presentes en el pasto, el cual provee estos parásitos y las condiciones de humedad óptimas para su crecimiento y sobrevivencia (Kumarasingha *et al.*, 2016). Cuando la L<sub>3</sub> llega a los tejidos y muda al estadio L<sub>4</sub> (hematófago), se producen daños histológicos en el abomaso (estómago verdadero) de los rumiantes; la anemia producida por la pérdida de sangre, se detecta por la caída de células aglomeradas (10-12 días después de la infección) y la disminución de la reserva de hierro; también se produce pérdida de proteínas y disminución en la capacidad de absorción de alimentos (Monjurul, 2019; Rivero *et al.*, 2019; Leyva-Mendivil, 2013; González-Garduño *et al.*, 2011); después de 10 a 12 días de la infección, el hábito hematófago del parásito le lleva a consumir al de 0.05-0.08 mL de sangre en un día (Cardona *et al.*, 2017; Angulo-Cubillán *et al.*, 2007); un ovino infectado con 10 000 larvas, puede presentar en 11 días, pérdidas de sangre de 30-50 mL (Besier *et al.*, 2016a; Angulo-Cubillán *et al.*, 2007). Se ha estimado que cerca del 10% del volumen sanguíneo diario es consumido por *H. contortus* (Rodríguez-Vargas, 2006), además de lo que se pierde al sangrar la herida (Rodríguez-Gómez, 2016). La gravedad de la enfermedad en el huésped está estrechamente unida por la cantidad de larvas de *H. contortus*, la pérdida de sangre y larvas adultas. Estudios han demostrado que *H. contortus*, a diferencia de otros NGI, se destaca por su gran patogenicidad y capacidad de resistir a todos los AH químicos probados en laboratorio (Sangster *et al.*, 2018; Harder, 2016; Kotze y Prichard, 2016).

## **2.2. Aspecto morfológico de *H. contortus***

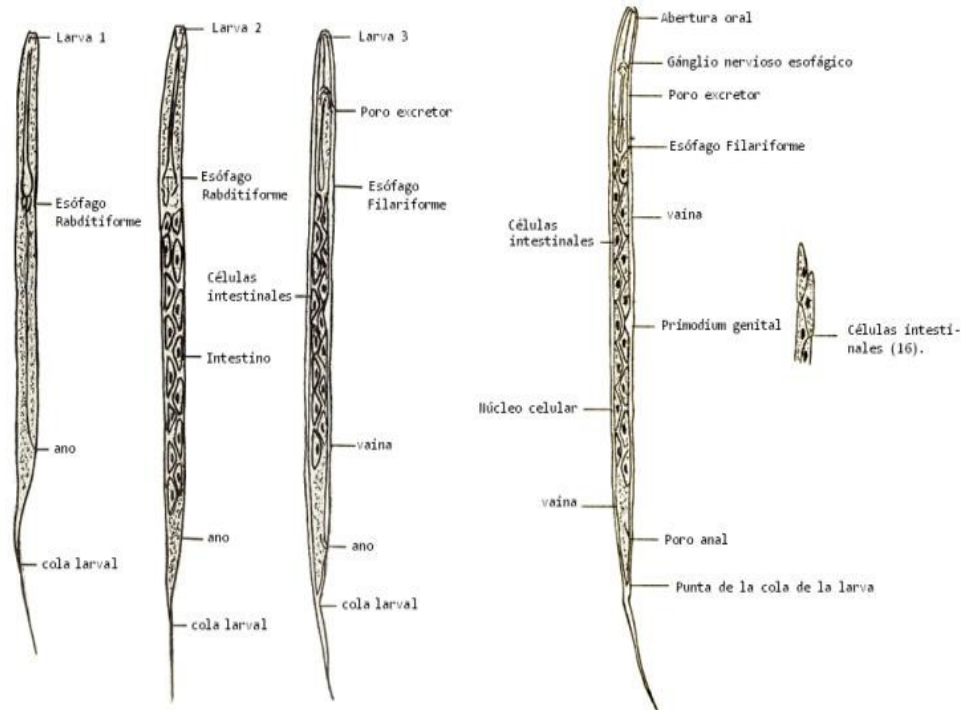
En la Figura 1 se muestran aspectos morfológicos de las larvas L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> de *H. contortus*. De la eclosión del huevo sale la larva L<sub>1</sub>; los huevos tienen forma ovoide (ovalada), son incoloros y están rodeados por una sustancia hialina, presentan poros desiguales en el cascarón, la cubierta es fina y lisa, con extremos de curvaturas y polos dispares de tipo strongilado; cuando los huevos son eliminados en las heces del hospedero contienen una mórula con segmentos o

muchos blastómeros que ocupa casi toda la yema (el interior). El tamaño promedio de un huevo es de 70-100  $\mu\text{m}$  de longitud y de 45-60  $\mu\text{m}$  de ancho (Yang *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2015; Wyk y Mayhew 2013). Las larvas  $L_1$  eclosionadas varían en tamaño, con un promedio de 345  $\mu\text{m}$  de longitud por 17  $\mu\text{m}$  de grosor en la parte del esófago. Las adaptaciones morfológicas de la  $L_1$  consisten en acortamiento del esófago, pérdida de espacio intestinal, aparición de núcleo celular en las células intestinales, formación de una nueva epidermis y un cambio en el tamaño de la larva) hasta que vuelve a la actividad y logra desprenderse de la epidermis vieja, proceso conocido como ecdisis. La forma del cuerpo es cilíndrica, disminuyendo gradualmente en grosor desde la base del esófago hasta la cola (Figura 1); esta forma típica es una manera de distinguirla del segundo estadio ( $L_2$ ). La apertura bucal de la  $L_1$  es de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, unida a un esófago de forma rhabditoide (con presencia de bulbo), con el cual succiona bacterias y detritus que le sirven de alimento. El esófago está conectado con el intestino, compuesto por ocho células de forma triangular que llegan hasta el recto (Yang *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2015; Wyk y Mayhew 2013; Veglia, 1916). La  $L_2$  inicia su etapa desde que sale del primer letargo; su longitud promedio es de 500  $\mu\text{m}$  y con un diámetro longitudinal uniforme desde el esófago hasta la cola. El esófago presenta un bucle, la epidermis exhibe líneas laterales bien formadas, sombreadas y el extremo de la cola presenta forma de gancho. Su alimentación es activa, como en el estadio  $L_1$ , y se alimenta hasta un segundo período de letargo que inicia aproximadamente a las 40 h de la primera ecdisis; en este segundo letargo se producen cambios morfológicos acompañados de una segunda ecdisis que dura entre 8-12 h y son dependientes de condiciones favorables del medio. Entre la segunda ecdisis y la primera, existe una diferencia importante, en la segunda no se produce un desprendimiento total de la epidermis, quedando anclada a la  $L_2$  en forma de vaina (Yang *et al.*, 2017; Taylor

*et al.*, 2015; Liébano-Hernández *et al.*, 2011; Wyk y Mayhew 2013). La cavidad bucal de la L<sub>3</sub> es ovalada, menor que la de L<sub>2</sub>. La larva L<sub>3</sub> mide aproximadamente 734 μm; los orificios naturales (boca, ano) de la larva propiamente dicha, están encerrados por la "vainas" de la segunda muda que no fue desprendida, pero son igualmente visibles. La vaina de la L<sub>3</sub> es semipermeable, compuesta por lípidos, colágeno y quitina, que le brinda soporte y protección contra inclemencias de su entorno (factores ambientales como frío, calor, radiación, compuestos químicos, etc.) (Taylor *et al.*, 2015). El largo del esófago de la L<sub>3</sub> es de 119-175 micras y filiforme, sin pronunciada deformación bulbosa y sin aparato valvular. Las 16 células intestinales dorsales y ventrales son de diferentes formas (triangulares, rectangulares o pentagonales); en muchos casos a la altura de la cavidad bucal se observa una placa quitinosa, oscura (Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005; Leyva-Mendivil, 2013).

La terminación de la cola de las L<sub>3</sub> es cónica, en muchos casos arrugada, que se adelgaza gradualmente y termina en una prolongación filamentosa. El largo de la cola de la vaina larval es de 119-159 micras (Yang *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2015; Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005). La L<sub>3</sub> infectante, protegida por la vaina, al ser ingerida por un hospedero se transforma en larva L<sub>4</sub> (hematófaga) sin vaina, con cápsula bucal ausente, y un estilete (diente tipo lanceta) para erosionar la mucosa del abomaso; el intestino de la L<sub>4</sub> es de color rojo debido a la sangre con la que se alimenta, esta coloración se alterna con el color blanco de los cordones sexuales enrollados alrededor del tubo digestivo (Dibarrat y Montes de Oca, 2012; Millares, 2010). La L<sub>4</sub> muda una vez más para transformarse en L<sub>5</sub> (pre-adulto) que representa la etapa de desarrollo de órganos reproductores para dar lugar a la etapa adulta; la L<sub>5</sub> se desarrolla sin mudas posteriores hasta diferenciarse sexualmente como nematodo adulto (NA). Los NA son largos, los machos pueden llegar a medir entre 10-20 mm de largo y 0.1-15 mm de ancho, y la

hembra de 18-30 mm de largo y 0.4-0.5 mm de ancho (Yang *et al.*, 2017; Emery *et al.*, 2016; Kumarasingha *et al.*, 2016; Wyk y Mayhew 2013). Los NA (2-3 cm) son fácilmente visibles; las hembras muestran un aspecto característico tipo “*poste de peluquero*” (por su traducción del inglés “*barber’s pole*”), esto debido al contraste rojo y blanco que se observa entre sus ovarios y el intestino lleno de sangre que se entrelazan en espiral a lo largo de su cuerpo. El cuerpo anterior posee papilas cervicales prominentes y la cutícula es lisa. La vulva usualmente se encuentra protegida por una solapa cuticular muy prominente, la cual puede tomar formas variadas. El nematodo macho, posee una bolsa copuladora muy desarrollada en dos lóbulos laterales simétricos largos y un lóbulo dorsal pequeño asimétrico en forma de “Y” invertida, posee un par de espículas de 400-500  $\mu\text{m}$  de longitud, presentando cada uno un pequeño gancho en su extremidad dorsal caracterizada por la asimetría del lóbulo dorsal; los lóbulos laterales de la bursa son grandes, mientras el rayo dorsal es pequeño y asimétrico (Taylor *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2001 en Anziani y Fiel, 2015).



**Figura 1.** Aspectos morfológicos de las larvas L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> de *H. contortus*. **Fuente:** Campos y Bautista (1989) en Leyva-Mendivil, (2013).

### 2.3 Ciclo biológico de *H. contortus*

El ciclo de vida de *H. contortus* es de 21-28 días; se divide en dos fases de desarrollo: una primera fase no parásita (~7 días) (exógena, de vida libre) y en la cual transcurren los estadios de huevo (en fase morular o previa), L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> y una fase parásita (~21 días) o endógena que se inicia con la ingesta de la L<sub>3</sub> y termina con el desarrollo de los parásitos, la cópula y la producción de huevos (Figura 2) (Mendoza-de Gives *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2004). Los huevos de *H. contortus* son fecundados en el estómago del hospedero en hembras adultas del nematodo, posterior a la copulación con un macho de la especie. Generalmente dentro de las hembras se pueden encontrar huevos con hasta cuatro blastómeros, mismos que son ovipositados en el interior del hospedero infectado. Incluso, el desarrollo embrionario puede continuar hasta una etapa con 11 blastómeros, y en

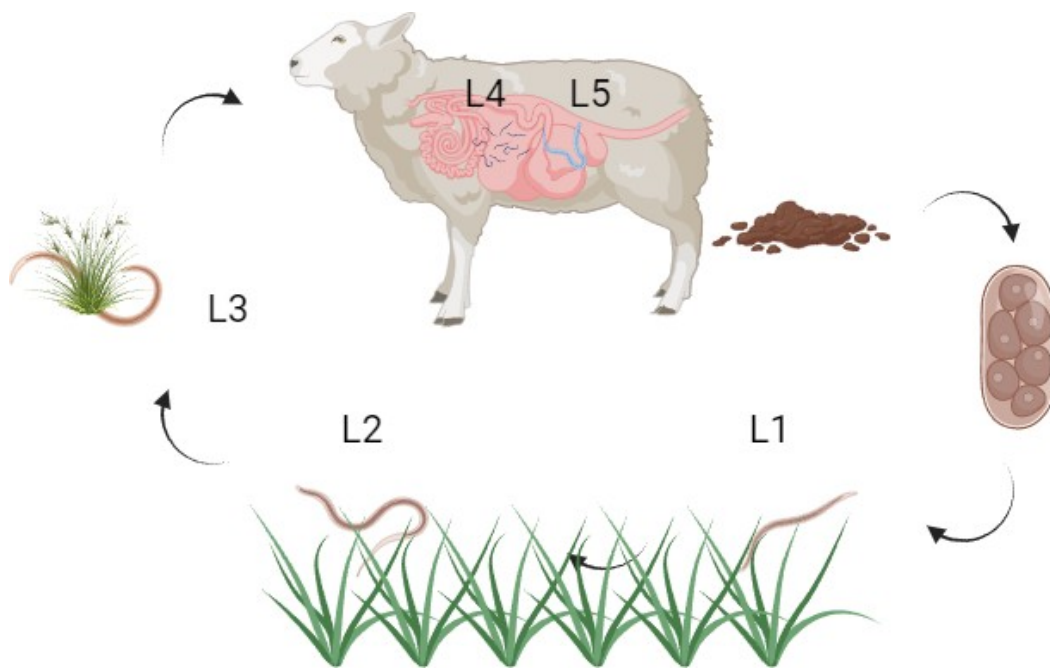
casos extremos es posible encontrar huevos en fase morular. Los huevos prácticamente indiferenciables son liberados con las heces; sin embargo, no suelen estar más allá de la etapa morular; sugiriendo que el oxígeno es necesario para la síntesis embrionaria. El huevo sigue su desarrollo en el entorno, observándose la fase de renacuajo a partir de las 6 h, y las etapas larvales embrionarias a partir de las 10 h. La alta prevalencia en suelos infestados se debe a la gran fertilidad de las hembras, que pueden poner entre 5 000 a 10 000 huevos por día dentro del hospedero (Soca *et al.*, 2005; Torres- Acosta *et al.*, 1995; Veglia, 1916).

La liberación de huevos en las heces fecales (fase pre-parasítica) marca el inicio de una corta travesía en el ambiente. Dentro del huevo se desarrolla la larva  $L_1$  y luego eclosionan en el pasto entre 24-30 h en condiciones óptimas (20 °C y 80% de HR) o favorables (1-2 días) dando inicio a la fase de “vida libre” (fuera del hospedero), con un comportamiento tipo rhabditoide (Emery *et al.*, 2016; Kumarasingha *et al.*, 2016); un periodo de eclosión de 4-8 días también se ha reportado (Hernández, 2011). La  $L_1$  se alimenta desde la primera hora de haber eclosionado y lo hace hasta entrar en un estado de letargo dentro de las 10-12 h posteriores a la eclosión, donde las larvas permanecen inmóviles y es común confundirlas con larvas muertas, en este estado se produce la formación de una nueva epidermis y un cambio en el tamaño de larva (Veglia, 1916). Después de dos a tres días, la  $L_1$  se desprende de la epidermis vieja y muda a  $L_2$ ; las  $L_1$  y  $L_2$  se alimentan de detritus y microorganismos del entorno. Entre el cuarto y séptimo día, las larvas  $L_2$  sufren una segunda muda para transformarse en la fase infectante ( $L_3$ ) (Rodríguez-Gómez, 2016) la cual mantiene su vaina, lo que le impide alimentarse del exterior, por lo que se alimenta de sus propias reservas energéticas de los estadios previos (Rodríguez-Labastida, 2019). La  $L_3$  tiene la facultad de adaptarse a diversas condiciones de humedad, temperatura,

precipitación pluvial, luminosidad y tipo de pasto, estos factores se relacionan con la sobrevivencia de las L<sub>3</sub> de *H. contortus*, si alguno de estos factores sufre variaciones, su población y distribución puede verse afectada (Munguía-Xóchihua *et al.*, 2018; Leyva-Mendivil, 2013; Liébano-Hernández *et al.*, 1998). La L<sub>3</sub> es extremadamente móvil a la luz intensa y busca refugio en el nano clima del subsuelo o en el tallo del follaje; a la luz tenue y en condiciones de humedad, habitualmente asciende de forma vertical hasta la parte superior de los tallos y hojas de los pastos, donde suele encontrarse en gotas de rocío durante la mañana y la tarde. Este hábito favorece la probabilidad de infección en los rebaños que usualmente acostumbran a pastar en condiciones similares (González, 2007; Vázquez *et al.*, 2004; Liébano-Hernández *et al.*, 1998). La supervivencia de la L<sub>3</sub> en el medio ambiente es de ~21 días, y su sobrevivencia depende de alojarse en un hospedero, como los rumiantes, los cuales ingieren pasto conteniendo L<sub>3</sub> envainadas (Rodríguez-Labastida, 2019; Rodríguez-Gómez, 2016; Hernández, 2015), lo cual marca el inicio del ciclo biológico del parásito. Una vez producida la infección en el rumen, allí pierden su vaina por acción del ácido clorhídrico (HCl) del tubo digestivo y por un proceso de compuestos no ionizados del tampón bicarbonato-CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> no disociado y gaseosos del rumen (Hernández, 2015), además del efecto de enzimas (lipasas, pseudocolagenasas y leucina aminopeptidasa), después llegan al orificio omaso-abomaso de ovejas y cabras alrededor de 10-20 min una vez ingeridas.

Las L<sub>3</sub> sin vaina una vez que penetran a las criptas de las glándulas epiteliales gástricas del abomaso, mudan al estadio L<sub>4</sub> (hematófago) y con su lanceta comienza a erosionar la mucosa abomasal para succionar la sangre del hospedero y provocar inflamación, siendo ésta la primera etapa de alimentación de sangre, la cual contiene glucosa, aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes, que pueden ser fácilmente absorbidos a través de la cutícula del nematodo (Taylor *et al.*, 2016;

Emery *et al.* 2016; Kumarasingha *et al.*, 2016). Aquí, las L<sub>4</sub> permanecen entre 10-14 días, en este periodo se puede desarrollar un fenómeno conocido como “hipobiosis” o desarrollo inhibido para regular su población, 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-Xóchihua *et al.*, 2018; Vázquez, 2000; Soca *et al.*, 2005); de no ser así, después de 4-5 días de alimentarse y crecer en la mucosa abomasal, las L<sub>4</sub> emergen a la luz (lumen) en la superficie de la mucosa hasta convertirse en larvas L<sub>5</sub> o pre-adultas (dos o tres semanas) las cuales también succionan sangre (Emery *et al.*, 2016; Kumarasingha *et al.*, 2016). El parásito pre-adulto (L<sub>5</sub>) se desarrolla sin mudas posteriores hasta diferenciarse sexualmente como NA con madurez sexual y capacidad de reproducirse como macho (10-20 mm) y hembra (18-30 mm) (Taylor *et al.*, 2016). Los NA de 2-3 cm de longitud (formas sexuales) copulan dando paso a la fecundación y huevos en el abomaso del huésped infectado; posteriormente, los huevos son expulsados junto con las heces del huésped (Taylor *et al.*, 2016; Kumarasingha *et al.*, 2016; Leyva-Mendivil, 2013). Tras la producción de huevos (fase de huevo), es como se cierra el ciclo.



**Figura 2.** Ciclo biológico de *H. contortus* en ovinos. L = Larvas; L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>= Larvas juveniles de vida libre; L<sub>4</sub> -L<sub>5</sub> (pre-adultas) = Larvas parásitas. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

#### **2.4 Control tradicional de *H. contortus***

En general, para el control de los NGI se han utilizado antihelmínticos (AH) químicos de amplio espectro y facilidad de uso (Antonio-Irinea *et al.*, 2021). Los productos AH más utilizados para el control de *H. contortus* son benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (LM) (Hernández-Bolio *et al.*, 2017). En el Cuadro 1 se muestran AH químicos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes. Algunos se absorben a través de la cutícula del nematodo como el levamisol y LM, mientras que otros lo hacen a través del tubo digestivo (benzimidazoles, morantel y pirantel) (Mehlhorn, 2008). Los rumiantes una vez tratados con AH químicos deben ser trasladados a praderas en las que no

hayan pastado recientemente o bien con pasturas limpias (Cepeda-Martínez, 2017). Sin embargo, la estrategia de control tradicional ha perdido eficacia debido a la frecuencia de administración, errores en la dosificación, elección incorrecta del fármaco y rápida reinfección, lo que ha provocado el problema de resistencia antihelmíntica (RA) (Medina *et al.*, 2014).

**Cuadro 1.** Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes.

<b>Amplio espectro</b>		
<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Principio activo</b>	<b>Familia farmacológica</b>
<b>Fijadores de tubulina</b>	Benzimidazoles	Camberidazol, Oxfendazol, Flubendazol, Mebendazol, Albendazol, Thiabendazol, Fenbendazol, Parbendazol, Luxabendazol, Triclabendazol.
	Probenzimidazoles	Febantel, Thlofanato, Netobimin
<b>Bloqueadores ganglionares</b>	Imidazotiazoles	Tetramisol, Levamisol,
	Tetrahidropirimidinas	Morantel, Pirantel
<b>Potenciadores GABA</b>		
<b>Doramectina</b>	Avermectinas Milbemicinas	Ivermectina, Abamectina Moxidectin
<b>Corto espectro</b>		
<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Principio activo</b>	<b>Familia farmacológica</b>
<b>Desacopladores de la fosforilación oxidativa</b>	Salicilanilidas	Cloxacida, Oxiclosanida. Rafoxanide, Closantel
	Sustitutos Nitrofenílicos	Nitroxinil Disofenol
<b>Antagonistas de acetilcolinesterasa</b>	Organofosforados	Triclorfom. Haloxon, Naftalofos, Diclorvos

**Fuente:** Harder, (2016).

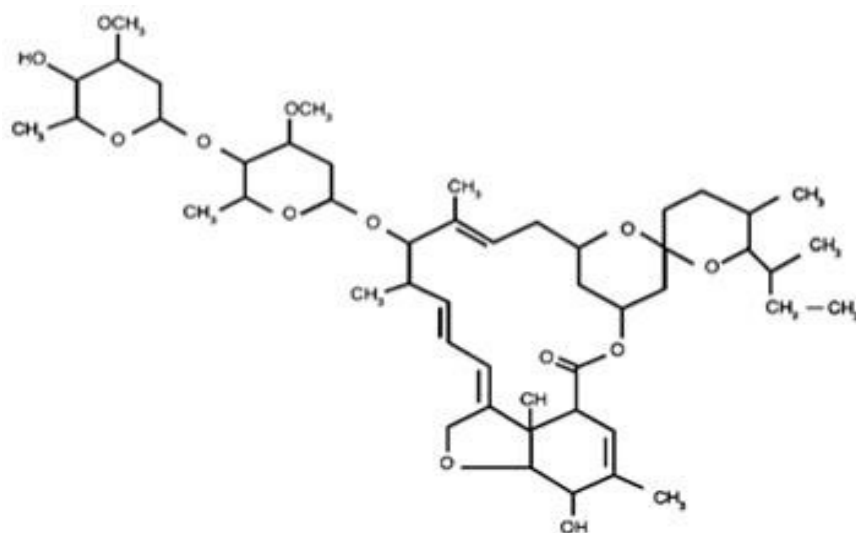
## **2.5 Resistencia antihelmíntica de los NGI**

La resistencia antihelmíntica (RA) se refiere a la disminución en la susceptibilidad de los parásitos ante una dosis de una droga que eliminaría la mayor parte de los parásitos (Mphahlele *et al.*, 2019). La resistencia surge como el resultado de una mutación a través de la repetición de exposición a la presencia de AH químicos, confiriéndole la resistencia de carácter genético y heredable de la sensibilidad de una población de parásitos a la acción del AH (López Arellano *et al.*, 2010). Los factores que determinan la RA se pueden clasificar en: 1) factores externos que dependen del mecanismo de acción de los AH, el grado de eficacia, frecuencia de los tratamientos, dosis, rotaciones y forma de manejo de los animales, y 2) factores internos que dependen específicamente de los NGI como las características genéticas (heredabilidad, dominancia, nivel de resistencia y habilidad biológica relativa); además de características biológicas (potencial biológico (reproductivo), intervalo entre generaciones, estadio expuesto a la droga y la proporción de la población en refugio (Torres-Vásquez *et al.*, 2007). La RA también ha sido asociada a polimorfismos o mutaciones genéticas en una de las moléculas diana de los parásitos, dando como resultado que los mecanismos de toxicidad de los AH químicos no estén funcionando de forma adecuada (Encalada-Mena *et al.*, 2014; Areskog *et al.*, 2014; Dzhafarov *et al.*, 2016).

## **2.6 Mecanismos de acción de antihelmínticos químicos**

Los AH químicos pueden actuar sobre los neurotransmisores inhibidores (NI) de los nematodos, como los ácidos g-butírico o gama aminobutírico (GABA) y el glutamato (Glu) que son los principales NI que activan los canales de Cl<sup>-</sup>, lo que hace que los impulsos nerviosos se interrumpan y provoquen parálisis y muerte del parásito (Joyner, 2010). Cualquier perturbación de uno de estos receptores por los AH químicos conduce a un deterioro de una o más actividades fisiológicas de los nematodos y, por lo tanto, a la muerte de los respectivos

parásitos. Uno de los AH químicos que actúa sobre los NI es la IVM del grupo de las lactonas macrocíclicas (LM) que causan parálisis de los músculos somáticos y faríngeos en los nematodos, al estimular el sistema inhibitor de actividades funcionales no vitales (Joyner, 2010); para rumiantes se ha reportado una dosificación de 200 µg por Kg de peso de IVM, su valor máximo en plasma se alcanza en un lapso promedio de 4 a 10 h, y su vida media es de 36 h en promedio (Ramírez-Correa, 2014). En *H. contortus* se han identificado cinco subunidades de NI (GluCl, HcGluCla, HcGluClb, HcGluCla3A y HcGluCla3B). Los GluCl están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso de *H. contortus*, lo que sugiere funciones críticas en el control de la locomoción, función faríngea, alimentación, puesta de huevos y posiblemente procesamiento sensorial en nematodos parásitos. Las LM (incluidos IVM, Avermectina, Abamectina, Eprinomectina, Doramectina, Moxidectina, Milbemicina Oxima y Selamectina) en los nematodos, activan los canales aniónicos, inhibiendo la transmisión neuronal y la contracción muscular (Joyner, 2010; Harder, 2016) ocasionándoles parálisis en los músculos somáticos y faríngeos (Portillo *et al.*, 2003). El GluCl, también se localiza en células musculares somáticas de la faringe y útero, y en sus neuronas asociadas. De tal manera que, cuando estos fármacos se unen a los receptores, la permeabilidad de la membrana al Cl<sup>-</sup> aumenta, originando una hiperpolarización de la membrana en las células musculares y/o neuronales; afectando en consecuencia, la capacidad de alimentación y fecundidad del parásito. Las IVM son bastante eficaces contra los estados larvarios y maduros de NGI. En la Figura 3 se muestra la estructura química de la IVM.

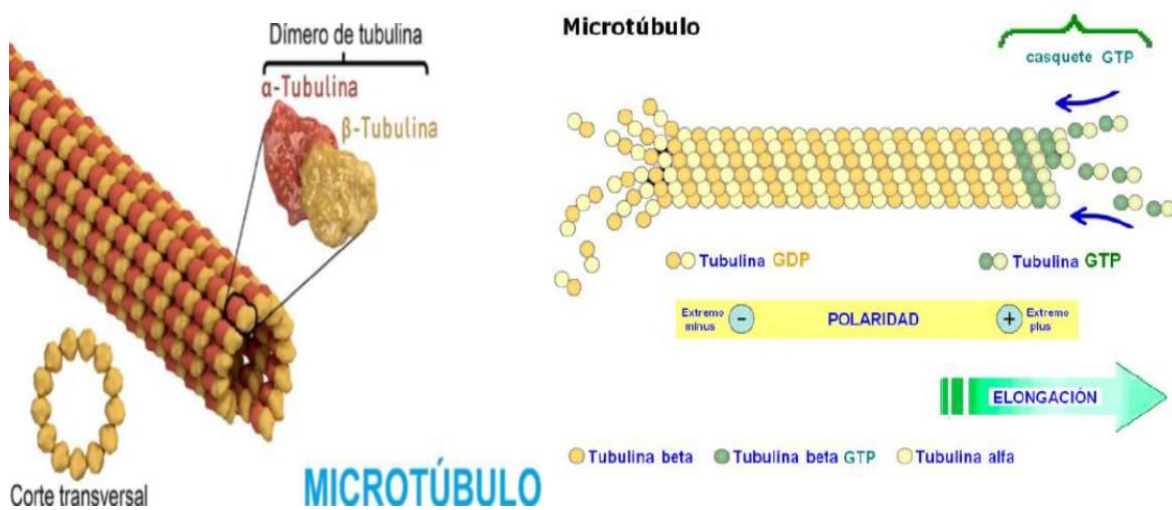


**Figura 3.** Estructura química de la Ivermectina. **Fuente:** San Andrés, 2007 en Ramírez-Correa, 2014.

La Ivermectina fue aprobada en 1997 por la FDA y está siendo usada en 90 países; es efectiva contra 183 especies de nematodos y 129 especies de insectos y ácaros. Su mecanismo de acción contra los nematodos susceptibles depende de su efecto sobre los canales de iones en la membrana celular (Joyner, 2010).

Existen otros fármacos que alteran la función microtubular de las células de los nematodos y son llamados inhibidores microtubulares (IMT), como los compuestos benzimidazólicos (Gregorio-Illescas, 2019). La acción AH del Albendazol (100% de eliminación de huevos y fases adultas de *H. contortus*), se debe a que inhibe la síntesis de los microtúbulos y altera irreversiblemente la captación de la glucosa, lo que da como resultado que el parásito se inmovilice o muera con lentitud por la falta de energía (Katzung, 2007 en Moreno García, 2013). Se ha demostrado que, en los nematodos, los microtúbulos están involucrados en una variedad de funciones fisiológicas como: puesta y eclosión de huevos, desarrollo de larvas, transporte de sustratos, secreción y actividad enzimática (Rew y Fetterer, 1986). Estos organelos forman parte del citoesqueleto

de células eucariotas teniendo gran relevancia en la homeostasis celular, debido a que están implicados en numerosas funciones como la formación del huso mitótico y transporte intracelular de nutrientes (Harder, 2016). Este proceso puede verse afectado por los IMT los cuales se unen competitiva y pseudo irreversiblemente a la  $\alpha$ -tubulina por el extremo positivo (+) inhibiendo la elongación del microtúbulo que, unido a la despolimerización del otro extremo, se induce un acortamiento de estos organelos hasta su deterioro completo y, por tanto, pérdida de la homeostasis celular (Gregorio-Illescas, 2019). Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un núcleo hueco, formados por la polimerización de la tubulina, una proteína dimérica con dos subunidades denominadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina (Figura 4) (Harder, 2016). En el cuadro 1, se muestran AH químicos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes.



**Figura 4.** Componentes de un microtúbulo celular.

**Fuente:** <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-zacatecas/farmacologia/antihelminticos-resumen-farmacologia-humana/6120366>

La presencia de residuos de AH químicos está adquiriendo extrema importancia económica, como lo demuestra la reducción observada recientemente en la exportación de carnes termoprocesadas de nuestro país a los E.E.U.U., como resultado de la detección de residuos de IVM en embarques a tal destino (Anziani y Fiel, 2015). La IVM se encuentra dentro de los medicamentos no aprobados en vacas lecheras, porque se pueden encontrar residuos en la leche por tiempo prolongado; y aunque se encuentren por debajo de los límites máximos que afectan al hombre, no se autoriza en hembras lactantes; se sabe que la IVM posee afinidad por el tejido adiposo que actúa como depósito del fármaco. Se ha reportado que Brasil es el mayor exportador mundial de carne bovina; en el 2014, las autoridades sanitarias de ese país, prohibió la producción, importación, comercialización y uso de todas las drogas consideradas como LM (Aparicio-Medina *et al.*, 2011; Anziani y Fiel, 2015).

## **2.7. Hongos comestibles como alternativa de control de NGI**

Con respecto a hongos comestibles, *Pleurotus* spp. ha demostrado alto potencial nematocida; los compuestos responsables de dicha actividad se han reportado de extractos del hongo o bien del sustrato donde se hacen crecer los hongos (Pineda-Alegría *et al.*, 2017; Aguilar-Marcelino, 2018; Cuevas-Padilla *et al.*, 2018; Sánchez-Salgado *et al.*, 2021). El primer compuesto nematocida aislado del género *Pleurotus* fue el ácido trans-2-decenedioico (Kwok *et al.*, 1992) obtenido de *P. ostreatus*, otros bioactivos nematocidas de este hongo son el peróxido de ácido linoleico (Satou *et al.*, 2008), y proteasas (André-Genier *et al.*, 2015).

En cuanto a la toxina identificada como ácido trans-2-decenedioico (NRL 3526) de *P. ostreatus* se encontró que inmovilizó el 95% de nematodos *Panagrellus redivivus* (Aldaz-Merchán, 2018). Otros estudios han notificado una nematotoxina de *P. ostreatus* llamada ostreanina que ataca a los nematodos provocando su muerte; además de producir bioproductos como: enzimas, proteínas, péptidos y

metabolitos secundarios para autodefensa (Sánchez-Salgado *et al.*, 2021; Rodríguez-Barrera, 2021). Algunos de los hongos donde se ha evaluado la actividad contra nematodos, son: *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* y *P. eryngii* (Heydari *et al.*, 2006; Comans-Pérez *et al.*, 2021); se han notificado alrededor de 200 compuestos tóxicos en los hongos con AN, y hasta el 2014, 23 especies del género *Pleurotus* spp. se reportaron con dicha actividad; al parecer un rasgo característico del género (Salmones *et al.*, 2020; Cruz-Arévalo, 2017). Especies como *P. ostreatus* y *P. eryngii* se han reportado con AN (*in vitro*) contra la fase L<sub>3</sub> de *H. contortus* con 97.2% y 98.1%, respectivamente (Salmones *et al.*, 2020). En el Cuadro 2 se muestran algunos de los compuestos bioactivos de algunas especies de *Pleurotus* con AN.

**Cuadro 2.** Compuestos bioactivos en especies de *Pleurotus* con actividad nematocida.

Especies de hongos	Nematodo	Etapa	Molécula bioactiva
<i>P. ostreatus</i>	<i>Panagrellus</i> sp.	Larva	Ácido trans-2-decenedioico.
<i>P. pulmonarius</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Larva	Ácido S-coriolic (1), ácido linoleico (2), p-anisaldehído (3), alcohol p-anisil (4), 1-(4-metoxifenil)-1,2-propanodiol (5) y 2- hidroxí-(4'-metoxi)- propiofenona (6).
<i>P. djamor</i>	<i>H. contortus</i>	Larva y huevo	Ácido pentadecanoico, ácido palmítico, β-sitosterol, ácido esteárico y ácido linoleico.
<i>P. ostreatus</i>	<i>H. contortus</i>	Larva y huevo	Xilitol, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, etanol 2-butoxi fosfato y un azúcar xilitol.
<i>P. djamor</i>	<i>H. contortus</i>	Larva y	Fracción E1: ácidos (i)

			huevo pentadecanoico, (ii) hexadecanoico, (iii) octadecadienoico y (iv) octadecanoico y un terpeno identificado como $\beta$ -sitosterol.
<i>P. eryngii</i>	<i>H. contortus</i>	Huevo y larva	Fracción E5: trehalosa, polioles (L-iditol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, y mioinositol), ácido adípico, ácido esteárico, escualeno, y $\beta$ -sitosterol.

---

**Fuente:** Castañeda-Ramírez *et al.* (2020).

En un estudio biodirigido se evaluó el extracto hidroalcohólico (EHA) de fructificaciones de *P. djamor* contra L<sub>3</sub> de *H. contortus*. En otro, la mayor AN observada fue contra los huevos de *H. contortus* observando hasta un 100% de inhibición en la fracción E1 a 10 mg mL<sup>-1</sup> después de 72 h. Los compuestos presentes en la fracción E1 fueron cuatro ácidos grasos: (i) pentadecanoico, (ii) hexadecanoico, (iii) octadecadienoico, (iv) octadecanoico, y un terpeno identificado como  $\beta$ -sitosterol (Pineda-Alegría *et al.*, 2017).

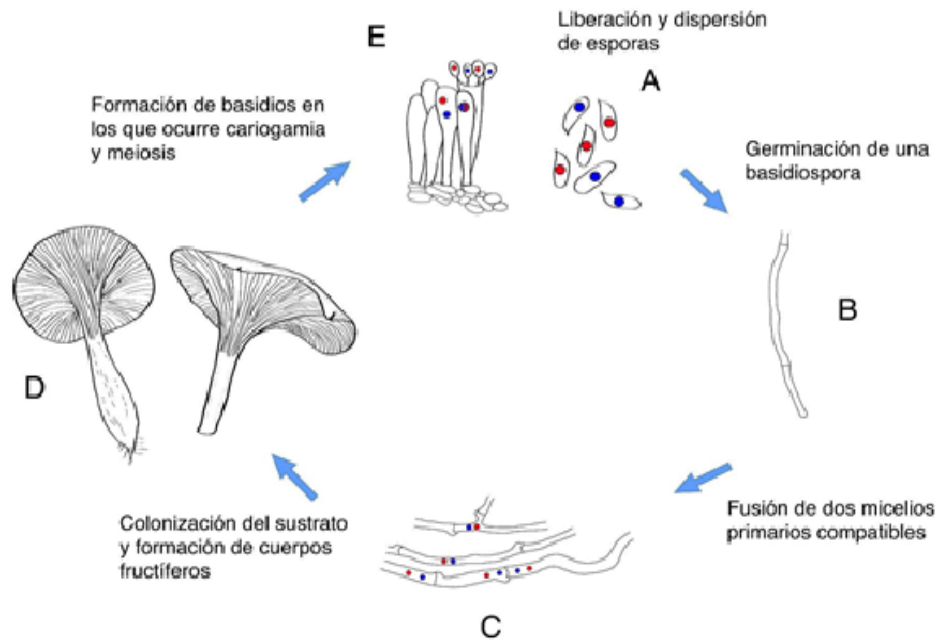
Diversos estudios *in vitro* (2014-2023) se han reportado contra nematodos parásitos de animales y plantas mostrando diferente AN sobre huevos y larvas de *H. contortus*; dicha actividad se ha atribuido a compuestos químicos como toxinas y ácidos grasos presentes en micelio, basidiomas y sustrato degradado (SD) de los hongos (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2024). También ha surgido la pregunta: de que, si antes de que los insumos lignocelulósicos estén expuestos al hongo, ¿tendrán actividad AH? (Martínez-Miranda, 2014). Se ha demostrado que la AN se ve favorecida por la sinergia entre moléculas contra *H. contortus*, esto al comparar las actividades de moléculas comerciales (ácido pentadecanoico, ácido palmítico,  $\beta$ -sitosterol, ácido esteárico y ácido linoleico) y sus combinaciones contra *H. contortus* (Klongsiriwet *et al.*, 2015). Díaz-Rodríguez en el 2015, utilizando cinco

mezclas de SD de *P. djamor*, reportó efecto nematocida entre 0 y 47% a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>. En el año 2016, un estudio realizado con 10 mezclas de SD de *Digitaria eriantha* Steud, *Zea mays* y *Coffea canephora*, demostró que los EHA de pulpa de café (*Coffea arabica*) mostraron actividad AH *in vitro*, atribuido a un grupo de compuestos de naturaleza fenólica (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021). El SD de *P. ostreatus* reportado por Páez-León, (2018) mostró 92% de mortalidad de larvas L<sub>3</sub> (%ML<sub>3</sub>) de *H. contortus*. En *Pleurotus* spp. también se ha informado AN en el SD con diferentes tiempos de colonización, encontrando un %ML<sub>3</sub> de 14.71 (SPS1) y 8.57 (SPS2) obteniendo mayores efectos contra L<sub>3</sub> en comparación con el sustrato estéril sin micelio (SEsm) y con 15 días de colonización (SPS), dicha AN se relacionó con compuestos bioactivos como triterpenoides, polisacáridos, nucleótidos, esteroides, esteroides, ácidos grasos y proteínas (Pineda-Alegría *et al.*, 2017; 2020; Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Con base a la sinergia entre moléculas, fue explicada la AN de la fracción "PdAct" (80% de mortalidad) frente al efecto de las mezclas obtenidas por fraccionamiento químico-biodirigido (mortalidad <66%) (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). Por otra parte, se ha notificado que el SD de *P. djamor* presenta actividad AH (Valdez-Urióstegui *et al.*, 2021., Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022). Los extractos (240 mg mL<sup>-1</sup>) de cuerpos fructíferos y micelio de *P. ostreatus* mostraron un %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* de 82.7 y 96.8, respectivamente, a las 72 h; mientras que el extracto del SEsm no presentó actividad significativa en contra de larvas L<sub>3</sub> (Valdez-Urióstegui, 2015 en Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021). Por otra parte, en las fracciones acuosa (PdAcO) y de acetato de etilo (PdAct) del extracto de SD después de la primera cosecha (SPS1), se encontró que la fracción de PdAct provocó un %ML<sub>3</sub> de 80.11 con 20 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que la fracción PdAcO presentó un porcentaje menor (15.99%) (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). En *P. djamor* (Pd), se han obtenido EHA del SD y después de evaluar a las 72 h a

diferentes concentraciones (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg mL<sup>-1</sup>) contra L<sub>3</sub> de *H. contortus*, se encontró que con 40 mg mL<sup>-1</sup>, los %ML<sub>3</sub> de los SD, de la primera cosecha (SPS1) y segunda cosecha (SPS2), fueron de 14.73 y 8.57%, respectivamente (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). Rodríguez-Barrera *et al.* (2021), Páez-León, (2021) y Colmenares-Cruz *et al.* (2021), evaluaron la actividad de 10 mezclas de SD de *P. ostreatus* (SDP) contra huevos y L<sub>3</sub> de *H. contortus*, de los estudios obtenidos por estos autores, se han registrado tres patentes: MX/a/2018/008394, MX/a/2020/008620 y MX/a/2021/002741) ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI).

### **2.7.1 Ciclo biológico de los hongos**

Los hongos se reproducen por vía sexual y asexual (Figura 5). Los del género *Pleurotus* se caracterizan por formar setas (cuerpos fructíferos, esporomas, basidiomas o basidiocarpos) (Contreras-Moreno *et al.*, 2022). En el himenio del basidioma, se producen esporas o basidiosporas con un solo núcleo haploide (Martínez-Miranda, 2014; Contreras-Moreno *et al.*, 2022). Si la espora se deposita en un entorno favorable, dará origen al micelio, el cual crecerá, y se ramificará. Dicha etapa inicial se conoce como micelio primario y está compuesto por células uninucleadas u homocarióticas (n). El micelio puede fusionarse con otro micelio compatible de otro individuo llamado plasmogamia y así formar el micelio secundario (n+n). El micelio dicariótico, formado por dos núcleos, puede crecer vigorosamente y multiplicarse vegetativamente. Eventualmente, se diferenciará para formar los cuerpos fructíferos conocidos como basidiomas (parte comestible) (Contreras-Moreno *et al.*, 2022; Sánchez y Royse, 2002).

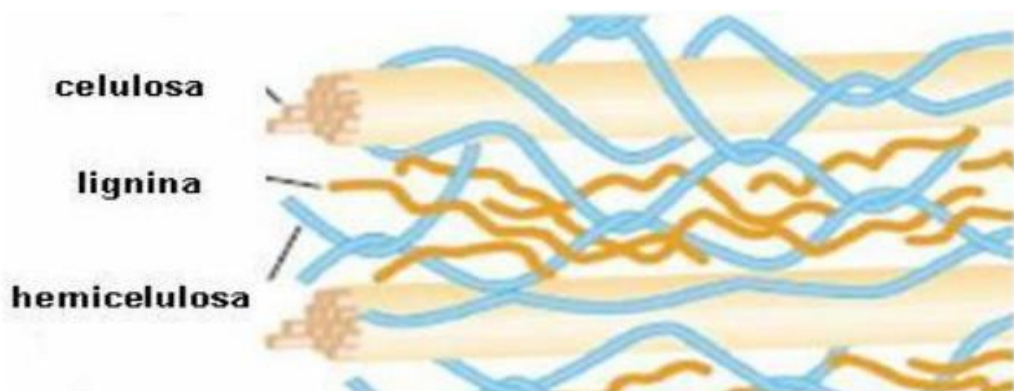


**Figura 5.** Ciclo de vida de *Pleurotus* sp. (A) Basidiosporas haploides ( $n$ ), (B) Micelio primario haploide ( $n$ ), (C) Micelio secundario dicariótico ( $n+n$ ), (D) Cuerpo fructífero, (E) Basidios. **Fuente:** Contreras-Moreno *et al.* (2022).

## 2.8 Sustratos lignocelulósicos para el cultivo de hongos comestibles

Los hongos macroscópicos poseen la ventaja de ser cultivados en diferentes sustratos de materiales enriquecidos en lignina y celulosa, es decir materiales lignocelulósicos (Puttaraju *et al.*, 2006). Los residuos agrícolas, como pajas, rastrojos y bagazos, así como desechos de la industria forestal, están conformados básicamente por lignocelulosa, sus principales componentes son la celulosa, hemicelulosa y la lignina (Mata *et al.*, 2017), principales componentes de la pared celular (PC) vegetal que se encuentran físicamente entrelazados y químicamente unidos a través de interacciones no covalentes y enlaces covalentes formando un complejo cristalino compacto (Figura 6) (Contreras-Moreno y García-Sandoval, 2022; Oropeza-Guerrero, 2017). La lignocelulosa (complejo macromolecular) es producido durante la fotosíntesis, por lo que cerca del 50%

de la biomasa del planeta está constituida por este material (Pérez *et al.*, 2002), el cual puede representar hasta 90% del peso seco de la biomasa vegetal (Mata *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Componentes de la pared celular vegetal. **Fuente:** <http://www.cerzosconicet.gov.ar/BoletinCERZO/2009-16/sabia.htm>

Entre los 200 residuos lignocelulósicos para la especie de *Pleurotus*, los más utilizados son: pajas, rastrojos, arroz, maíz, trigo, papa dulce, caña de azúcar, soya, tabaco, plátano, entre otros (Martínez-Miranda, 2014). Los materiales que se elijan para la preparación de sustratos en el cultivo de *Pleurotus* spp. deben ser uniformes, con calidad constante y continuidad en el suministro, buena disponibilidad en cantidad y continuidad, características fisicoquímicas adecuadas, regularidad en su composición físicoquímica, precio de adquisición ventajoso, localización fácil y cercana, y facilidad de transporte y manejo (Muez y Pardo 2002; Picornell *et al.*, 2017). Los sustratos deben tener una capacidad de retención de humedad entre el 70-80% para un crecimiento óptimo de los hongos (Oropeza-Guerrero, 2017). Las especies de *Pleurotus* son conocidas por su capacidad para crecer y fructificar en una amplia gama de sustratos, además tienen la habilidad para crecer en un intervalo de temperaturas cercanas a la

ambiental (22 a 28 °C) (Guadarrama-Mendoza, 2013). Se han notificado más de 90 sustratos lignocelulósicos distintos alrededor del mundo para cultivar *Pleurotus* spp. (Mata *et al.*, 2017). La capacidad de los hongos para utilizar los diferentes sustratos lignocelulósicos como fuente de nutrientes es debido a la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas que le permiten degradar estas moléculas en compuestos de bajo PM de fácil absorción, como la glucosa y maltosa para realizar sus funciones básicas de crecimiento y fructificación (Mata *et al.*, 2017).

En México, se ha estimado que el 70% de los residuos agrícolas producidos, se desecha y se desperdicia de manera inadecuada al ambiente (Mata *et al.*, 2017; Morales-Nava, 2020). Sin embargo, muchas investigaciones se han realizado para adaptar el cultivo de *Pleurotus* a los diferentes sustratos disponibles, así se han reportado más de 35 sustratos para el cultivo de hongos de este género (Mata *et al.*, 2017). Solamente, en el año 2014, para el proceso de producción de hongos comestibles se emplearon aproximadamente 500 000 toneladas de residuos derivados de actividades agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez y Ramírez, 2016; Morales-Nava, 2020). También se ha reportado que, derivado de esta actividad, en México se desechan aproximadamente 160 000 toneladas de sustrato cada año (Morales-Nava, 2020). En la producción de hongos comestibles, el SD se obtiene una vez que la producción del hongo ha cesado, es decir, después de que el hongo ha completado su ciclo de crecimiento y ha agotado los nutrientes disponibles en el sustrato, por lo que no quedan más nutrientes para la absorción y nutrición del hongo; dichos nutrientes provienen principalmente de los insumos lignocelulósicos usados para la elaboración del sustrato (Martínez-Miranda, 2014). Entre las especies comestibles de *Pleurotus*, se encuentra *P. djamor* un hongo tropical, de ciclos de cultivo cortos y altos valores nutricionales, con basidiomas de color rosa (Figura 7), cultivado comercialmente en algunos países asiáticos y otras regiones del mundo (Salmones, 2017).



**Figura 7.** Basidiomas de *Pleurotus djamor var. Salmoneustramineus* creciendo en paja de cebada. **Fuente:** Salmones, 2017.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La alta prevalencia de NGI en ovinos es una de las principales causas de disminución en la productividad y rentabilidad. Las infecciones parasitarias en los pequeños rumiantes son causadas entre el 80-90% por el nematodo *H. contortus*, considerado el más patógeno por ocasionar pérdida masiva de sangre y de peso, entre otros síntomas, hasta la muerte de animales jóvenes. La infección comienza con la ingesta de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) presentes en el pasto. El uso continuo e indiscriminado de AH químicos comerciales ha provocado RA y efectos negativos en el medio ambiente y en la población; por lo que se han implementado nuevas estrategias sostenibles, como el uso de hongos comestibles; entre los cuales el género *Pleurotus* ha demostrado alto potencial nematicida en estudios *in vitro*. Los compuestos responsables de la actividad AH varían según la parte del hongo utilizada o el sustrato donde crecen. El SD es un subproducto orgánico que se obtiene una vez que la producción de hongos ha cesado y el cual se elabora a partir de desechos lignocelulósicos agroindustriales. Estudios *in vitro* de extractos orgánicos de SD de *Pleurotus* spp. han demostrado efecto nematicida significativo contra *H. contortus*, expresado en porcentaje de mortalidad de larvas infectantes, y del cual se han aislado e identificando metabolitos que se han relacionado con tal actividad. Sin embargo, la actividad AH del sustrato estéril sin micelio (SEsm), ha sido poco estudiada, y los reportes encontrados muestran efecto no significativo. Por lo que el objetivo del presente trabajo, fue realizar un estudio micoquímico-biodirigido de dos extractos orgánicos de SD de *P. djamor* así como del SEsm, en proporciones (%) de los insumos: *Digitaria eriantha* Steud, *Zea mays* y *Coffea canephora*, 16.66, 16.66 y 66.66 (T2) y 33.33, 33.33 y 33.33 (T5), respectivamente, para evaluar *in vitro* el porcentaje de mortalidad de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* e identificar mediante CG-

EM metabolitos con actividad nematicida, expresando además la concentración efectiva ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) mediante un análisis PROBIT.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Realizar un estudio micoquímico-biodirigido de dos extractos orgánicos (T2 y T5) de sustrato degradado de *P. djamor* contra *H. contortus*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. A partir de extractos etanólicos, obtener fracciones por bipartición, utilizando disolventes de diferente polaridad, para evaluar actividad nematicida *in vitro* y seleccionar las de mayor actividad antihelmíntica.
2. Identificar por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas los metabolitos presentes en las fracciones químicas de mayor actividad nematicida.
3. Estimar mediante un análisis PROBIT las concentraciones efectivas medias ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) de las fracciones de mayor actividad nematicida.

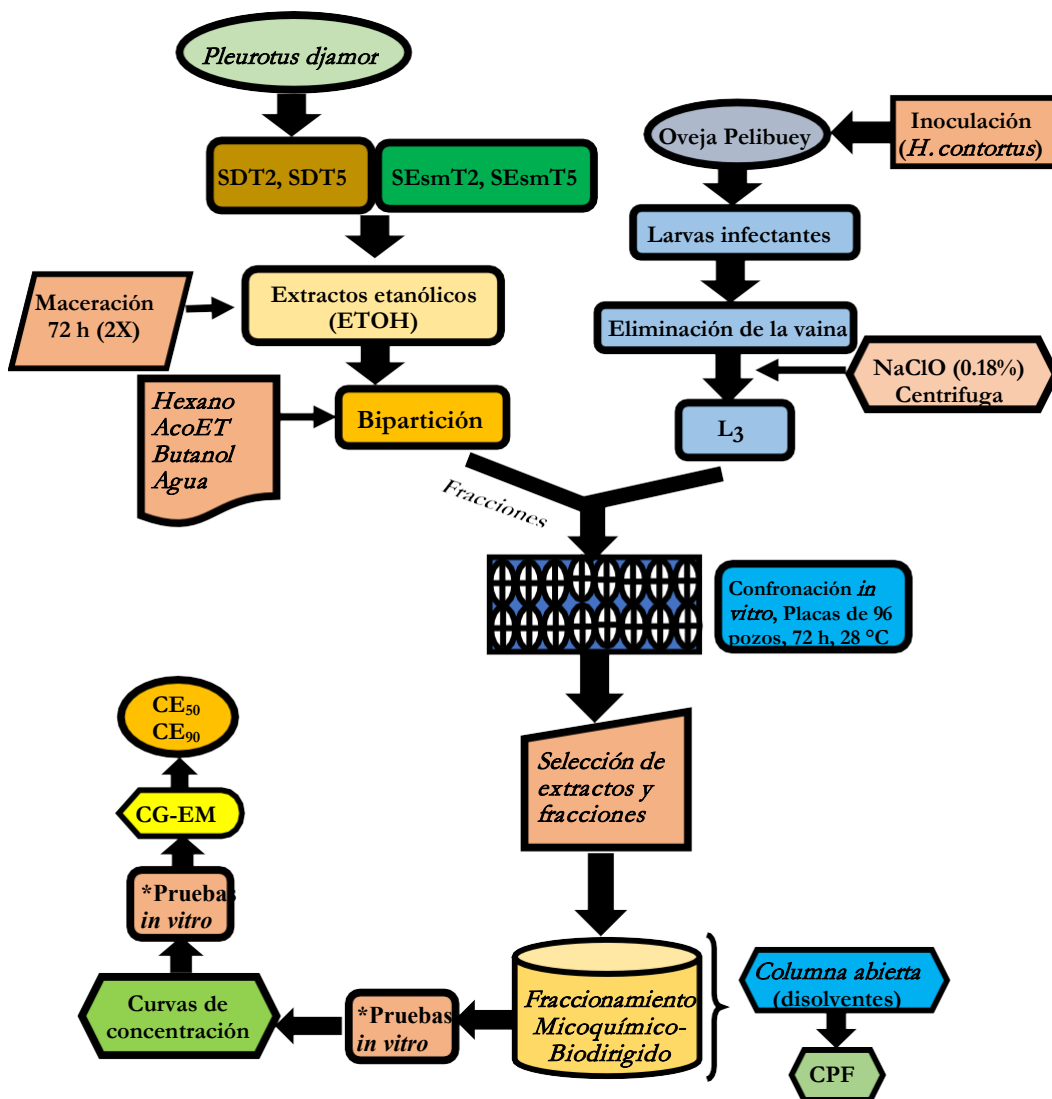
## 5. HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos (T2 y T5) del sustrato degradado de *P. djamor* presentan actividad nematicida *in vitro* contra larvas infectantes ( $L_3$ ) *H. contortus*, no así el sustrato sin micelio.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Esquema general de trabajo

En la Figura 8 se muestra de manera general el esquema de trabajo de la presente investigación.



**Figura 8.** Procedimiento general para la obtención de metabolitos con actividad nematocida de *P. djamor* y obtención de larvas infectantes de *H. contortus*. L<sub>3</sub>= Larvas infectantes; SD= Sustrato degradado; CG-EM= Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas; CPF = Cromatografía en Placa Fina.

## **6.2 Localización**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en Cuernavaca, Morelos, México; en el Laboratorio de Metabolómica del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, Estado de Morelos, México, en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el Municipio de Xochitepec, Morelos, México, y en el Laboratorio de Hongos Tropicales del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), en Tapachula, Chiapas, México.

En la Figura 9 se muestran fotografías de las instituciones donde fueron realizadas las diferentes actividades del presente trabajo.



**Figura 9.** Instituciones donde se realizó la presente investigación: (A) CIB-UAEM; (B) CENID-SAI INIFAP; (C) CIBIS-IMSS; (D) ECOSUR.

### **6.3 Obtención de larvas infectantes de *H. contortus***

Las larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* fueron de la cepa “Paraíso” resistente a Benzimidazol (Chan-Pérez *et al.*, 2016), proporcionadas por el Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Para la producción de las larvas se infectó (4000 L<sub>3</sub> vía oral) artificialmente un ovino donador de la raza Pelibuey (4 meses de edad, 30±1 kg). El ovino se mantuvo 21 días en una jaula metabólica (NOM-051-ZOO-1995 y LEY FEDERAL DE SALUD ANIMAL) para su alojamiento y alimentación. Con las heces, colectadas del recto del ovino, se hizo un coprocultivo (28 °C), previa homogenización con hule espuma y 70% de humedad. Después de siete días y con la técnica del embudo de *Baermann* se recuperaron las L<sub>3</sub>, eliminando las heces con agua destilada. Las L<sub>3</sub> recuperadas con vaina se almacenaron a 4 °C (Chan-Pérez *et al.*, 2017; Liébano-Hernández *et al.*, 2011; Pineda-Alegría, 2019).

#### **6.3.1 Eliminación de la vaina de las larvas L<sub>3</sub>**

Las L<sub>3</sub> con vaina de *H. contortus* se depositaron en tubos de centrífuga de 15 mL, los cuales contenían hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.187%; después de 10 min, se centrifugó (3500 rpm por 3 min). El sobrenadante con las vainas se descartó, y el precipitado con las larvas desenvainadas se lavó cuatro veces con agua destilada mediante centrifugación (3500 rpm por 3 min) eliminando los sobrenadantes en cada lavado. Se obtuvo un precipitado con L<sub>3</sub> sin vaina el cual se mantuvo en refrigeración hasta su uso (Liébano-Hernández *et al.*, 2011).

### **6.4 Obtención de extractos etanólicos del SD de *P. djamor* y sustrato estéril sin micelio, de T2 y T5**

Los SD (T2 y T5) de *P. djamor* (cepa ECS-0123) de la segunda cosecha de basidiomas fueron proporcionados por el Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez del Laboratorio del ECOSUR del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) ubicado en

Tapachula Chiapas, México. Para su elaboración se usaron insumos lignocelulósicos: olote de maíz (*Zea mays* L.), pasto Pangola (*Digitaria eriantha* Steud) y pulpa de café (*Coffea canephora*) en diferentes porcentajes (%) (Cuadro 3). El desarrollo masivo de micelio de *P. djamor* para la obtención del SD, se obtuvo mediante la metodología de Quimio (2002); bajo este mismo procedimiento se obtuvo el sustrato estéril sin micelio (SEsm). Los sustratos obtenidos fueron llevados a sequedad a temperatura ambiente (~30 °C).

Los sustratos estériles sin micelio (SEsm) de los tratamientos T2 y T5, se elaboraron con el mismo procedimiento y los mismos porcentajes de los insumos lignocelulósicos usados para el SD de *P. djamor* (Cuadro 3). El Cuadro 4 muestra el total de sustratos evaluados en el presente estudio.

**Cuadro 3.** Porcentaje de insumos lignocelulósicos usados para obtener los SD de *P. djamor* de T2 y T5.

Tratamientos	<i>Zea mays</i> (%)	<i>Digitaria eriantha</i> Steud (%)	<i>Coffea canephora</i> (%)
T2	16.66	16.66	66.66
T5	33.33	33.33	33.33

**Cuadro 4.** Sustratos evaluados de los tratamientos de T2 y T5.

Tratamientos	Sustrato estéril (Sin inóculo o micelio)	Sustrato degradado de <i>P. djamor</i> (2da cosecha)
T2	SEsmT2	SDT2
T5	SEsmT5	SDT5

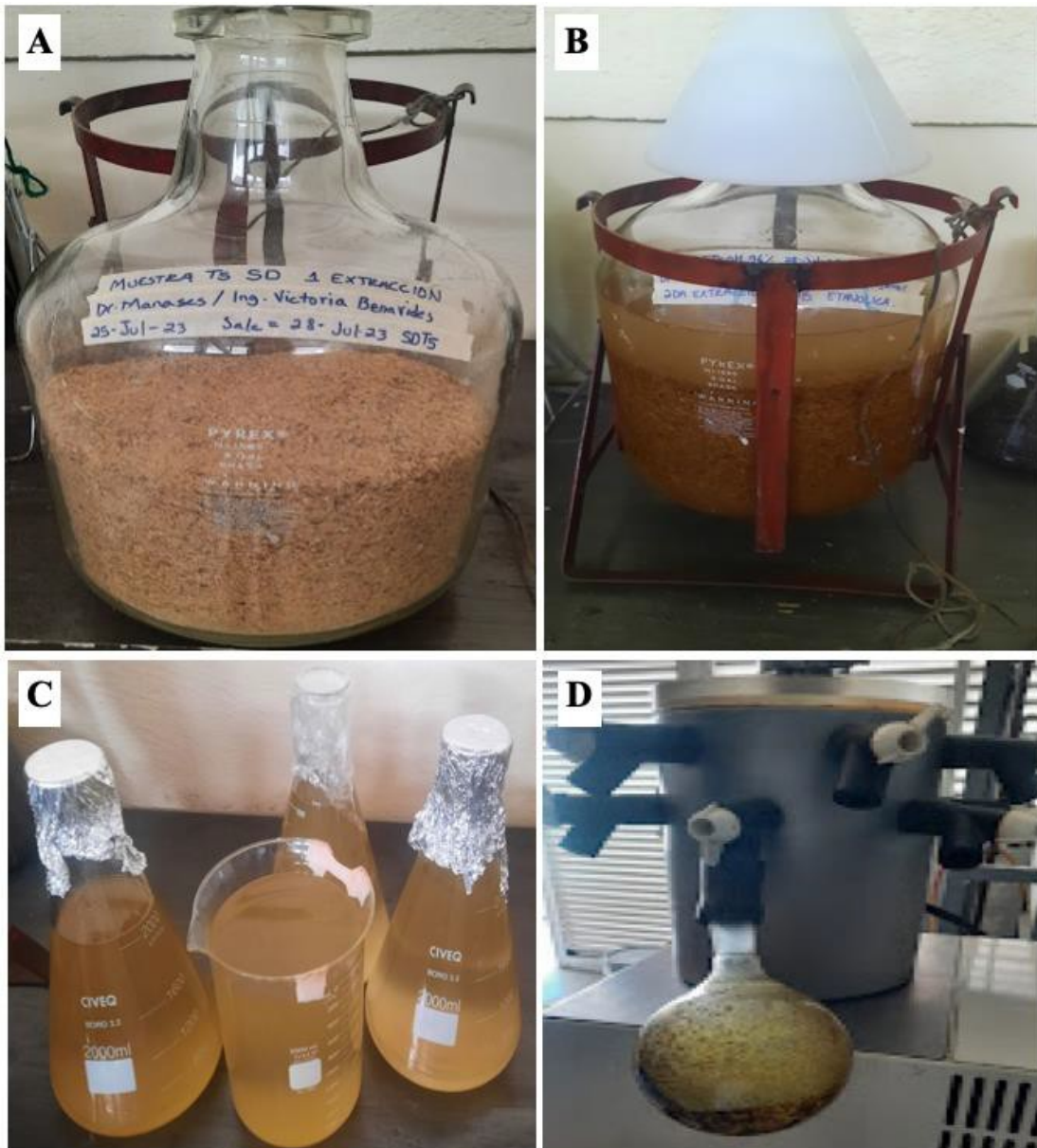
Los sustratos secos (2000 g de cada uno), de SD de *P. djamor* y SEsm (Figura 10), se molieron usando un molino convencional (Figura 11), después y por separado, se colocaron en garrafrones de 19 L de vidrio y se agregó etanol (ETOH 96°) hasta cubrir todo el material fúngico para hacer una maceración durante 72 h; posteriormente, se realizó un filtrado usando un embudo de vidrio y gasas para separar el material sólido (Figura 12). Al material sólido se le hizo una segunda maceración y filtración bajo las mismas condiciones. Los dos filtrados etanólicos obtenidos de cada muestra se juntaron y se procedió a concentrar en un rotavapor para eliminar el disolvente (Figura 12). Los extractos crudos obtenidos se liofilizaron para eliminar cualquier resto del disolvente (Figura 12). De esta manera se obtuvieron los extractos etanólicos (EE) secos del SD (EESD-T2 y EESD-T5) y del SEsm (EESEsm-T2 y EESEsm-T5); de cada extracto se separó una porción llamado extracto etanólico (EE) concentrado el cual se utilizó en la técnica de confrontación *in vitro* de inhibición de la motilidad (mortalidad) de larvas. Estas porciones fueron refrigeradas a 4 °C hasta su uso.



**Figura 10.** Sustratos secos. (A) SD de *P. djamor*; (B) SEsm. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.



**Figura 11.** Molino convencional para la obtención de polvos de los SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.



**Figura 12.** Proceso de maceración para obtener los extractos etanólicos. (A) Muestra del sustrato; (B) Maceración del sustrato; (C) Recuperación de las fases líquidas de los sustratos; (D) Liofilización de los extractos. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

## 6.5 Obtención de fracciones por bipartición de los extractos etanólicos

Para el fraccionamiento por bipartición, no se utilizó la porción concentrada separada de los EE, sino la cantidad restante de cada EE: 34.19 g (EESD-T2), 17.29 g (EESD-T5), 28.83 g (EESEsm-T2) y 42.12 g (EESEsm-T5). Para esta técnica se usó un embudo de separación de vidrio en el cual se depositó cada uno de los EE de los SD de *P. djamor* por separado; primeramente, se agregó una solución agua-metanol 3:2 (v: v). Al embudo se le colocó su tapón de vidrio y se agitó manualmente para homogeneizar la mezcla y después decantar las dos fases (líquida y sólida); la fase sólida se fraccionó con hexano (3 veces; 2:1, 1:1, 1:1) (v:v) y bajo las mismas condiciones que la primera, se hizo la separación de las dos fases; las tres fracciones de hexano se juntaron y se pasaron al rotavapor para recuperar y eliminar el disolvente, y obtener así la fracción de hexano (H); el mismo procedimiento se realizó con acetato de etilo (3 veces, 2:1, 1:1, 1:1) (v:v) y con butanol saturado de agua (una sola vez, 1:2) (v: v) para obtener las correspondientes fracciones de acetato de etilo (AE) y de butanol (B); después de la extracción con butanol, se recuperó la fracción acuosa (A) (Álvarez-Zapata *et al.*, 2015). Cada una de las fracciones se concentró en un rotavapor para eliminar el respectivo disolvente, después se liofilizaron para obtener las fracciones libres de humedad (secos). Bajo este mismo procedimiento se obtuvieron las fracciones del SEsm de T2 y T5. De esta manera, se obtuvieron los extractos de diferente polaridad de H, AE, B y A de cada sustrato. En la Figura 13, se muestran las etapas del proceso por bipartición para obtener las fracciones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5.



**Figura 13.** Etapas del proceso por bipartición para obtener las fracciones del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. (A) Separación en embudo de vidrio; (B) Concentración en rotavapor; (C) Secado por liofilización. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

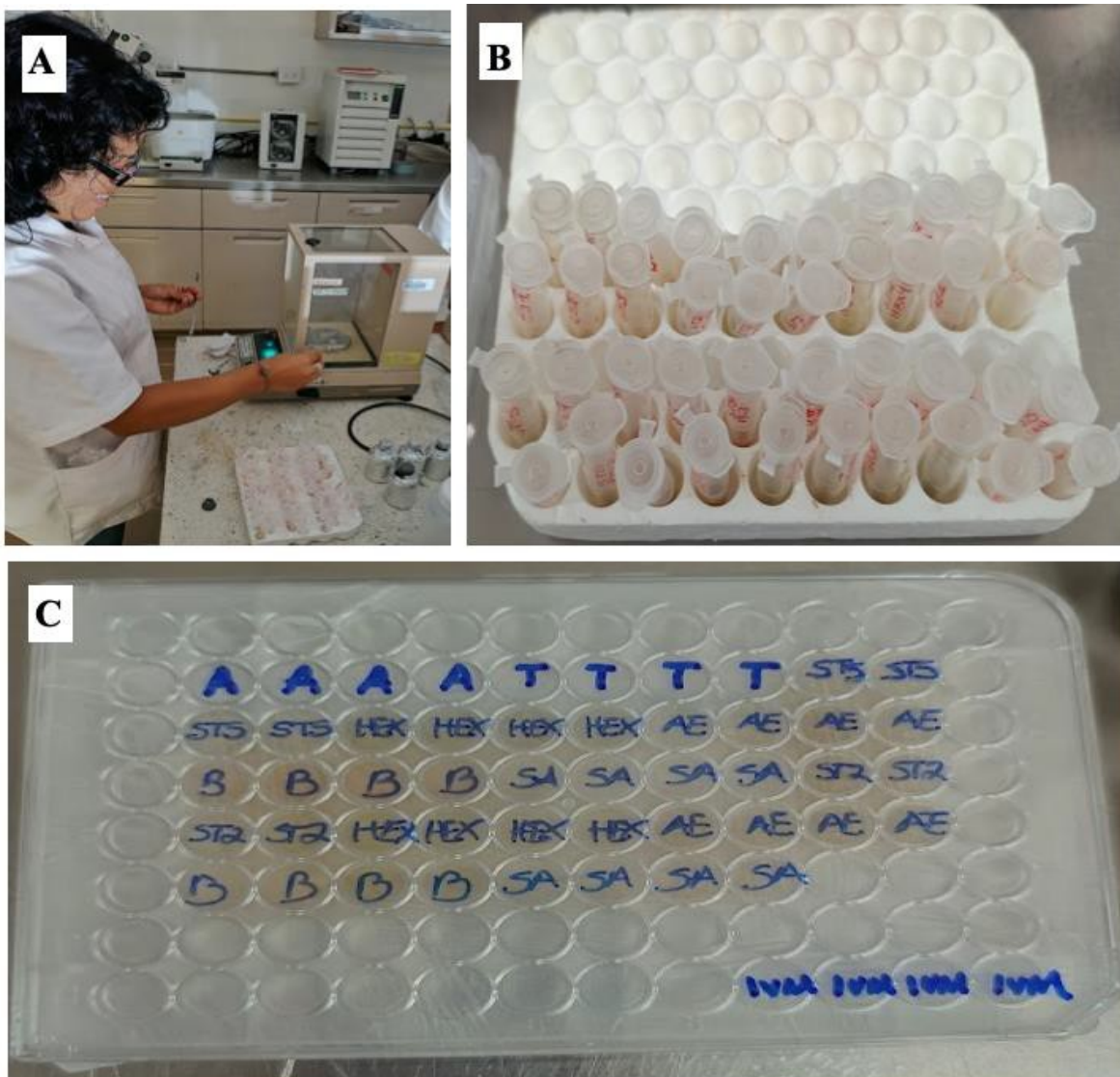
### **6.5.1 Confrontación *in vitro* para evaluar el efecto nematocida de los extractos etanólicos concentrados y las fracciones, de los SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, mediante el porcentaje de mortalidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus***

La confrontación *in vitro* se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos. Se formaron 8 series (4 réplicas) con 100 larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* en 50  $\mu$ L de agua destilada. La serie uno (control negativo) con 50  $\mu$ L de Tween-80 al 2.5%; la serie dos (control positivo) 50  $\mu$ L de IVM (10 mg mL<sup>-1</sup>) y de la tres a la ocho se sometieron a evaluación: (1) los extractos etanólicos (EE) concentrados y (2) las fracciones obtenidas por bipartición con diferente polaridad (H, AE, B, A) de los SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. Las placas de microtitulación se cubrieron con papel aluminio y se incubaron durante 72 horas a 28 °C. Posteriormente, en un microscopio óptico con objetivo de 40X, se cuantificaron las larvas inmóviles

(muertas) de *H. contortus* presentes en cada pozo (Pineda-Alegría *et al.*, 2017). El porcentaje de mortalidad de larvas infectantes (%ML<sub>3</sub>) de *H. contortus* fue determinado aplicando la ecuación reportada por Páez-León, (2021).

$$\%ML3 = \frac{(\bar{X}Control\ negativo - \bar{X}Grupo\ tratado)}{(100 - \bar{X}Control\ negativo)} * 100$$

Las muestras de SD de *P. djamor* y SEsm que mostraron mayor actividad nematicida, se sometieron a una segunda confrontación *in vitro* bajo las condiciones antes mencionadas usando los testigos blancos correspondientes, así como los grupos testigos positivo (IVM) y negativos (Agua, Tween-80) usados en la prueba *in vitro*. En la Figura 14 se muestran algunas etapas de la técnica *in vitro* de inhibición de la motilidad de larvas para cuantificar los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.



**Figura 14.** Etapas de la técnica *in vitro* de inhibición de la motilidad de larvas para cuantificar los %ML<sub>3</sub>. (A) Peso de los extractos; (B) Diluciones de los extractos etanólicos y las fracciones, de T2 y T5; (C) Placa de microtitulación con la prueba *in vitro*. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

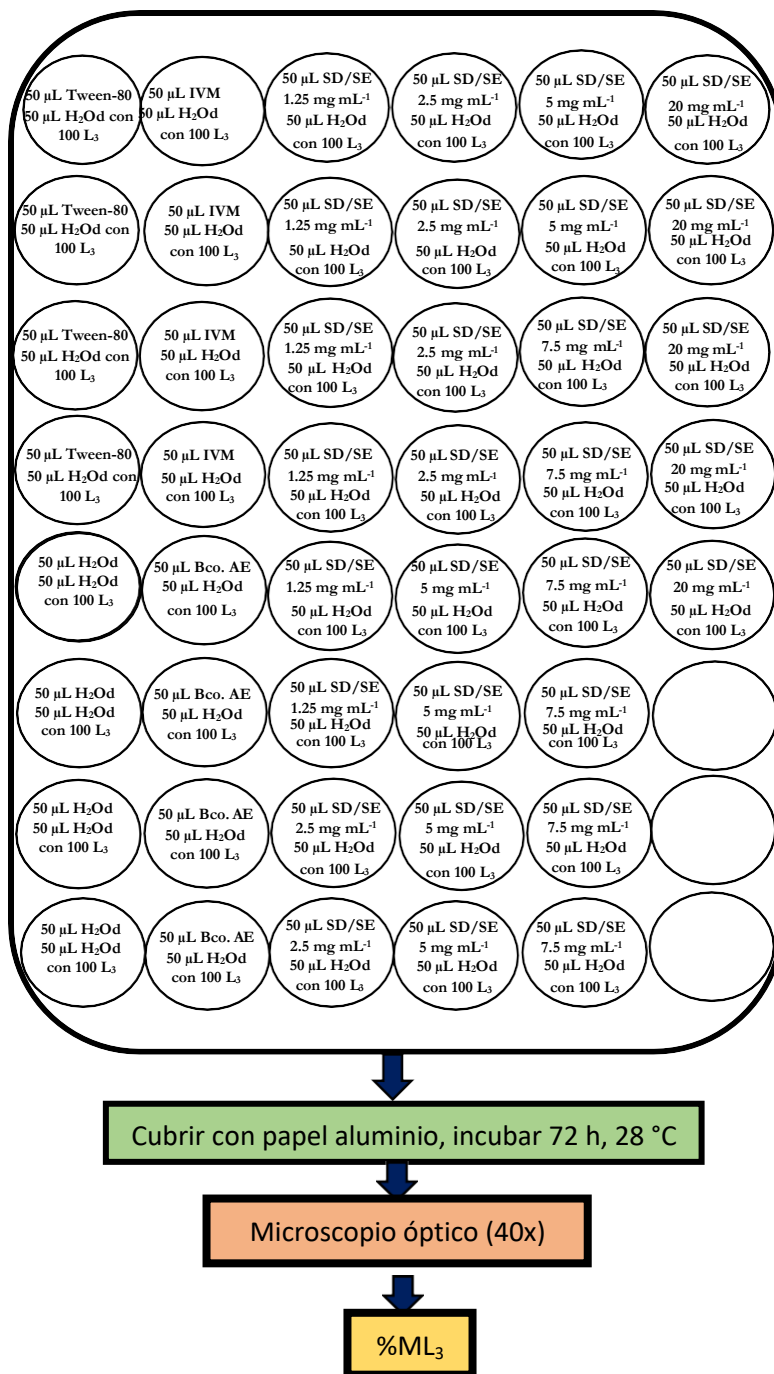
## **6.6 Curva de concentración para evaluar el efecto nematicida de los extractos etanólicos concentrados y de las fracciones de acetato de etilo y del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 contra L<sub>3</sub> de *H. contortus***

Las fracciones de acetato de etilo (AE), de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, seleccionadas por presentar los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* más altos, se sometieron a una confrontación *in vitro* evaluando cinco concentraciones: 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 y 20, mg mL<sup>-1</sup>. Primeramente, se realizaron pruebas de solubilidad usando cuatro disolventes (Cuadro 5). El experimento se realizó por duplicado incluyendo los grupos testigos positivo (IVM) y negativos (Agua, Tween-80); de cada muestra se evaluaron seis réplicas. La confrontación *in vitro* se realizó bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 6.5.1, incluyendo además el testigo negativo: Bco. AE. En el Cuadro 5 se presenta el total de muestras evaluadas en la confrontación *in vitro* para determinar los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, mostrando las concentraciones del grupo testigo (GT) positivo (IVM) y negativo (Agua, Tween-80 y Bco. AE), y de los EE concentrados y las fracciones de AE de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2. La actividad nematicida se evaluó en un microscopio óptico (40X) cuantificando el número de larvas L<sub>3</sub> inmóviles (muertas) (Pineda-Alegría, 2017). El %ML<sub>3</sub> se obtuvo mediante la ecuación notificada por Páez-León, (2021) (apartado 6.5.1). La Figura 15 muestra una representación esquemática de la técnica de confrontación *in vitro* para cuantificar el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* en los SD de *P. djamor* y SEsm de T2, se muestran cuatro réplicas del grupo testigo y las seis de las cinco concentraciones evaluadas, ya sea para el SD de *P. djamor* ó SEsm.

**Cuadro 5.** Concentraciones del grupo testigo (positivo y negativo) y de los extractos etanólicos concentrados y las fracciones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, para evaluar el efecto nematocida *in vitro* sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*.

GT, EE, Fracción	%, mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>
Tween-80	2.5%	-	-	-	-
H <sub>2</sub> Od	100%	-	-	-	-
IVM	10	-	-	-	-
Bco. AE	5%	-	-	-	-
SDT2-EE	1.25	2.5	5	7.5	20
SDT2-AE	1.25	2.5	5	7.5	20
SDT2-H	1.25	2.5	5	7.5	20
SEsmT2-CE	1.25	2.5	5	7.5	20
SEsmT2-AE	1.25	2.5	5	7.5	20
SEsmT2-H	1.25	2.5	5	7.5	20

GT= Grupo testigo; H<sub>2</sub>Od= Agua destilada; IVM= Ivermectina; EE= Extracto etanólico concentrado; H= Fracción de hexano, AE= Fracción de acetato de etilo; SD= Sustrato degradado, SEsm= Sustrato estéril sin micelio; T2 y T5= Tratamientos.



**Figura 15.** Representación esquemática de la confrontación *in vitro* para cuantificar los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* en el grupo testigo y en las cinco concentraciones de la fracción de AE de SD de *P. djamor* y SE (sustrato estéril sin micelio), de T2. **Fuente:** esquema adaptado por la autora del presente estudio del procedimiento de Pineda-Alegría *et al.* (2017).

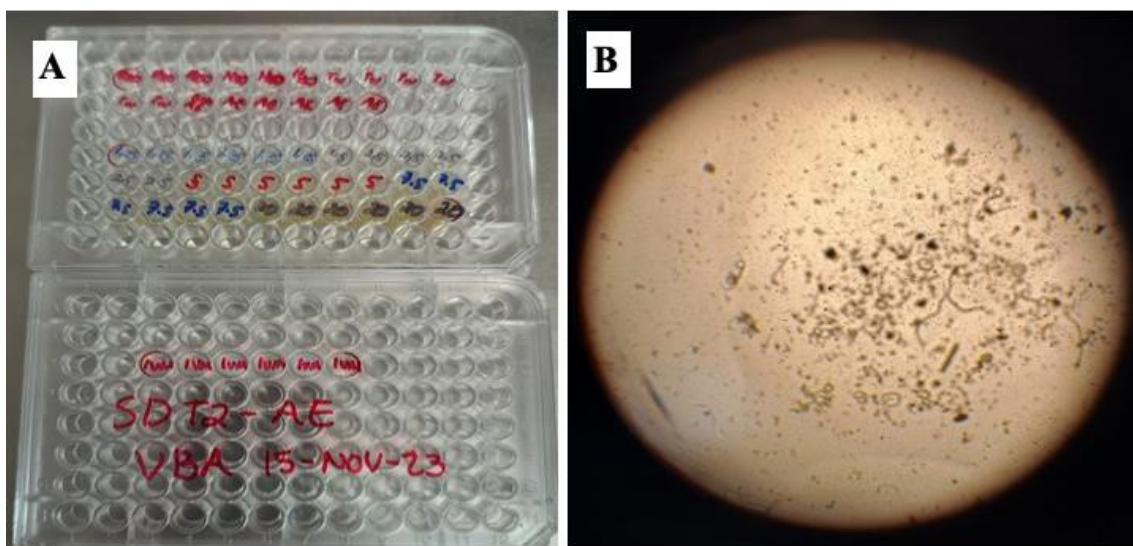
## 6.7 Fraccionamiento micoquímico-biodirigido de la fracción de acetato de etilo de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2

Se utilizó la técnica de cromatografía en columna abierta de fase normal para realizar el fraccionamiento de la fracción de AE obtenida por bipartición del SD de *P. djamor* y del SEsm, de T2. Para el fraccionamiento se utilizaron de un total de 6.2 g de SDT2-AE, 6.0 g, y de 0.8 g de SEsmT2-AE, 0.6 g; reservado los 0.2 g restantes para las muestras de referencia (MR). En esta técnica se utilizó una columna de vidrio (60 cm de largo × 4.5 cm de diámetro interno) con una llave de cierre. La columna se empacó con 10 g de sílica (tamaño de partícula 0.04-0.06, Merck, Germany). Para realizar la separación, se utilizaron tres sistemas de elución de Hexano-Acetato de etilo: 90:10, 80:20 y 70:30 (v:v).

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna (C): SDT2-AEC de *P. djamor* y SEsmT2-AEC, se sometieron a un análisis por cromatografía en placa fina (CPF). Las corridas cromatográficas por CPF se realizaron con diferentes sistemas de elución de Hexano-Acetato de Etilo: 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 y 30:70 para obtener los perfiles cromatográficos de los compuestos retenidos en las placas de sílica con base a su Rf. Los compuestos eluidos en las placas fueron visualizados en cámaras de luz UV (254-365 nm); la placa del sistema de Hexano-Acetato de Etilo fue revelado con sulfato cérico  $Ce(SO_4)_2$  (Cuevas-Padilla *et al.*, 2018; Pineda-Alegría *et al.*, 2017; 2020). De las 22 fracciones de SDT2-AEC corridas por CPF se obtuvieron cinco reuniones (“R”) de 0.02g de cada una: “R2”, “R3”, “R4”, “R5” y “R6”, y la MR-SDT2-AEC (sin fraccionar en la columna), y para SEsmT2-AEC se escogieron cuatro reuniones: “R2”, “R3”, “R5” y “R8”, y la MR-SEsmT2-AEC (sin fraccionar en columna). Finalmente, las reuniones obtenidas por CPF fueron secadas con aire y se almacenaron a -4 °C (González-Cortázar *et al.*, 2020).

### 6.7.1 Confrontación *in vitro* para evaluar el efecto nematicida de las reuniones obtenidas de las fracciones de SDT2-AEC de *P. djamor* y SEsmT2-AEC mediante el porcentaje de mortalidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus*

Las reuniones (“R”) obtenidas de las fracciones de SDT2-AEC de *P. djamor* y SEsmT2-AEC, así como las dos muestras de referencias (MR) se sometieron a una confrontación *in vitro* bajo las condiciones ya mencionadas en apartados anteriores y con la misma finalidad de determinar los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. En este experimento se utilizaron 0.005 g de cada reunión y MR; también se incluyeron los grupos positivo (IVM) y negativos (Agua, Tween-80, Bco. AE). En esta prueba se determinaron las reuniones de mayor actividad antihelmíntica para ser evaluadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). En la Figura 16 se muestra la prueba *in vitro* realizada para evaluar el efecto nematicida de las reuniones obtenida por CPF y una observación al Microscopio Óptico (40X) para el conteo de larvas inmóviles (muertas).



**Figura 16.** Representación de la confrontación *in vitro* para evaluar la actividad nematicida de las reuniones obtenidas por CPF del SDT2-AEC de *P. djamor* y SEsmT2-AEC contra L<sub>3</sub> de *H. contortus*. (A) Prueba *in vitro*; (B) Observación al microscopio óptico (40X). **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

### **6.8 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) de las reuniones de mayor efecto nematocida del SDT2-AEC de *P. djamor* y SEsmT2-AEC contra L<sub>3</sub> de *H. contortus***

De las reuniones (“R”) de SDT2-AEER y de SEsmT2-AEER que mostraron los porcentajes más altos de mortalidad de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*, se tomaron 0.015 g de cada una y se enviaron para su análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). El procedimiento que se siguió fue el siguiente: las reuniones por separado fueron disueltas en AE (1:1), de esta solución se tomaron 2 µL y se inyectaron con una microjeringa en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de energía ionizante (Agilent 7890B-5977A-MSD a 70 eV). Se utilizó una columna HP-5 MS de 30 m de longitud x 250 µm x 0.25 µm de grosor recubierta con 5% de difenil metilsiloxano. Como gas acarreador se utilizó Helio al 99.9%. Se utilizó una velocidad de flujo constante del gas acarreador de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector fue de 300 °C, y la temperatura de la línea de transferencia fue de 310 °C. La temperatura de la estufa fue mantenida a 50 °C por 1 min y después se incrementó a 300 °C, y esta se mantuvo por 1 min. Finalmente, la temperatura se incrementó 10 °C por min hasta llegar a 310 °C y se mantuvo en esta por 20 min. Los espectrogramas obtenidos se obtuvieron en función del tiempo de retención (TR) en minutos y la absorbancia relativa (100%). El tiempo de corrida de cada muestra fue de 49.78 minutos. La interpretación de los espectros de masas fue realizada mediante comparación computarizada con espectros de masa espectral en las bases de datos del Instituto Nacional de Tecnología y Estándares (NIST), versión 14.0.

## 6.9 Análisis estadístico

Los datos crudos de actividad AH se sometieron a un análisis estadístico para obtener los porcentajes promedios de  $ML_3$  de *H. contortus* ajustados con los  $\%ML_3$  obtenidos de los grupos testigos positivo y negativos; se usó el paquete estadístico "R" (2019) y la prueba de *Shapiro-Wilk* para contrastar la normalidad a través del valor de p (valor de probabilidad); la prueba de F en el análisis representó la variabilidad de las medias de los grupos, mientras más dispersas estuvieron las medias, mayor fue su valor. Al encontrarse significancia estadística entre los tratamientos se procedió a realizar una comparación múltiple de medias aplicando la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) a una probabilidad del 5% ( $p < 0.05$ ). La concentración efectiva ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) se estimó mediante los valores correspondientes de la  $CE_{50}$  y  $CE_{90}$  y sus límites fiduciales con un intervalo de confianza del 95% para la fracción de acetato de etilo de cada sustrato mediante un análisis de regresión "PROBIT" con el paquete estadístico SAS versión 9.0 y el procedimiento GLM, el valor de significancia fue de 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ) y una probabilidad de  $p < 0.0001$ . La ecuación Probit se calculó en Excel.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Rendimientos de extracción de los extractos etanólicos concentrados obtenidos por maceración del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5

En el Cuadro 6 se muestran los rendimientos (g) de extracción de los EE concentrados del SD de *P. djamor* (SDPd) y SEsm, de T2 y T5, obtenidos después de dos maceraciones. En total se obtuvieron cuatro EE: 2 del SD de *P. djamor* y 2 de SEsm. El rendimiento más alto se obtuvo con el SEsm tanto en T2 como en T5; entre los SD de *P. djamor*, el mayor rendimiento se obtuvo con T2 que con T5.

**Cuadro 6.** Rendimientos (g) de extracción de los extractos etanólicos concentrados obtenidos por maceración del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5.

Sustrato	T2 (g)	T5 (g)
SDPd-EE	6.60	1.93
SEsm-EE	10.51	8.27

EE= Extracto etanólico concentrado; SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*; SEsm= Sustrato estéril sin micelio; T2, T5= Tratamientos.

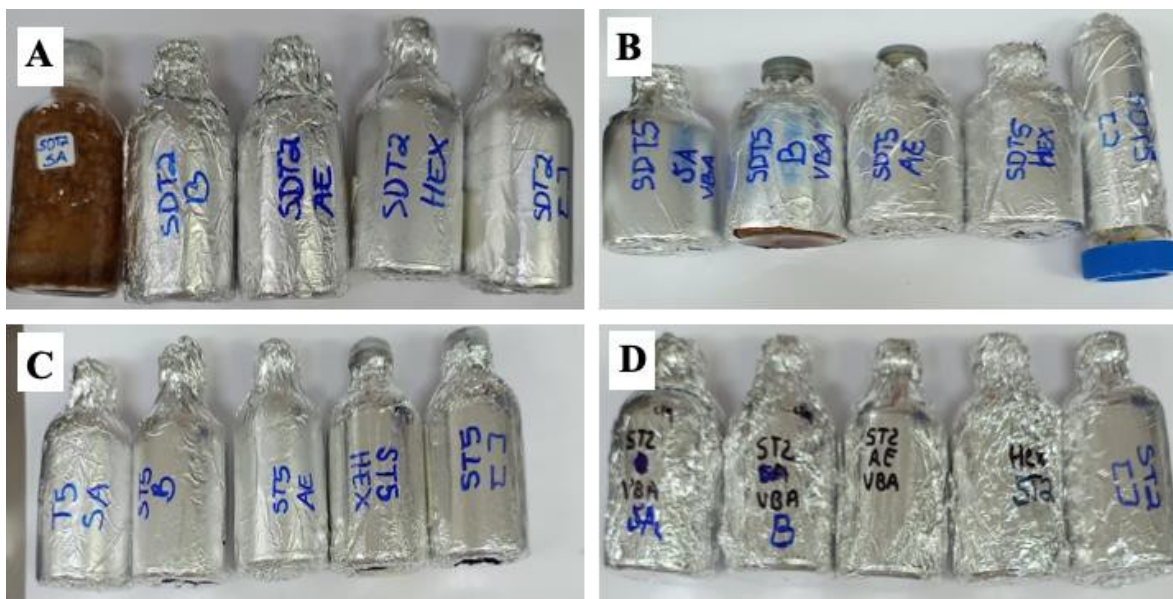
### 7.2 Rendimientos de extracción de las fracciones del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, obtenidas por bipartición a partir de los extractos etanólicos concentrados

En el Cuadro 7, se muestran los rendimientos de extracción de las fracciones obtenidas por bipartición del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, obtenidos a partir de los EE concentrados. En total se obtuvieron 16 fracciones, ocho de T2 y ocho de T5 a partir de cuatro disolventes (H, AE, B y A). En la Figura 17, se muestran las muestras de los EE y las fracciones obtenidas por bipartición, en total 20 (10 de T2 y 10 de T5).

**Cuadro 7.** Fracciones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, obtenidas por bipartición con disolventes de diferente polaridad a partir de los extractos etanólicos concentrados.

Fracciones	T2	T5
H	SDPdT2-H, SEsmT2-H	SDPdT5-H, SEsmT5-H
AE	SDPdT2-AE, SEsmT2-AE	SDPdT5-AE; SEsmT5-AE
B	SDPdT2-B, SEsmT2-B	SDPdT5-B; SEsmT5-B
A	SDPdT2-A; SEsmT2-A	SDPdT5-A; SEsmT5-A

H=Fracción de hexano; AE= Fracción de acetato de etilo; B= Fracción de butanol; A= Fracción acuosa; SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*, SEsm= Sustrato estéril sin micelio T2, T5= Tratamientos (Álvarez-Zapata *et al.*, 2015).



**Figura 17.** Extractos etanólicos concentrados y fracciones obtenidas por bipartición, de T2 y T5. (A) SD de *P. djamor*, T2; (B) SD de *P. djamor*, T5; (C) SEsm, T2; (D) SEsm, T5. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

El Cuadro 8, muestra los rendimientos (g) de extracción de las fracciones obtenidas por bipartición a partir de los EE concentrados de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. En el SD-T2 de *P. djamor*, el mayor rendimiento (12.73 g) se obtuvo con la fracción acuosa (SDPdT2-A), y el menor (0.92 g) con butanol (SDPdT2-B). En el SD-T5 de *P. djamor*, el mayor rendimiento fue con acetato de etilo (SDPdT5-AE, 6.96 g), y los más bajos (1.91 y 1.92 g), con el SDPdT5-H y SDPdT5-B, respectivamente. En cuanto al SEsm, en T2 y T5, los rendimientos más altos se obtuvieron con la fracción acuosa (SEsmT2-A) y los más bajos con butanol (SEsmT5-B).

**Cuadro 8.** Rendimientos (g) de extracción de las fracciones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, obtenidas a partir de los extractos etanólicos concentrados.

Fracciones	T2 (g)	T5 (g)
<b>SDPd-H</b>	3.25	1.91
<b>SDPd-AE</b>	6.91	6.96
<b>SDPd-B</b>	0.92	1.92
<b>SDPd-A</b>	12.73	4.25
<b>SEsm-H</b>	7.31	5.97
<b>SEsm-AE</b>	1.05	5.86
<b>SEsm-B</b>	0.32	1.45
<b>SEsm-A</b>	8.57	16.34

H=Fracción de hexano; AE= Fracción de acetato de etilo; B= Fracción de butanol; A= Fracción acuosa; SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*; SEsm= Sustrato estéril sin micelio T2, T5= Tratamientos.

### 7.3 Evaluación de la solubilidad de los extractos etanólicos concentrados y de las fracciones del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5

El Cuadro 9, muestra los resultados de la prueba de solubilidad con base en una evaluación visual (cualitativa) que presentaron los EE concentrados obtenidos

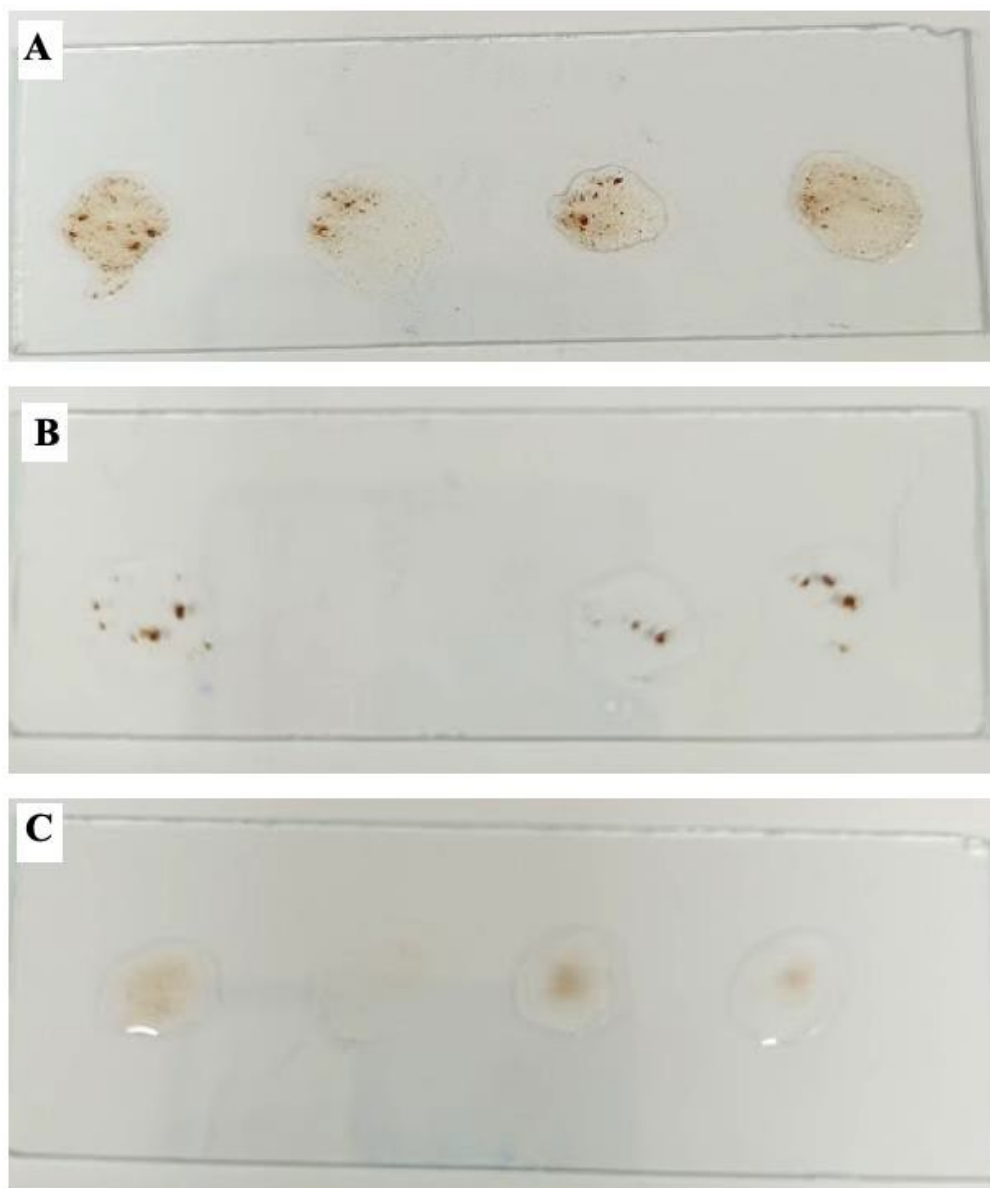
por maceración y de las fracciones obtenidas por bipartición de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. De los cuatro disolventes evaluados, el Tween-80 al 2.5% fue el que mostró mayor solubilidad, en comparación con el metanol y etanol, en los cuales se observó baja solubilidad en la mayoría de las muestras evaluadas.

**Cuadro 9.** Solubilidad en cuatro disolventes que presentaron los extractos etanólicos concentrados, y sus fracciones obtenidas por bipartición a partir de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5.

EE/Fracción	PBS (pH~7.4)	Tween-80 (2.5%)	Etanol (2.5%)	Metanol (2.5%)
SDPdT2-EE	+++	++++	XX	XX
SDPdT5-EE	+++	++++	XX	XX
SEsmT2-EE	+++	++++	+++	+++
SEsmT5-EE	+++	++++	XX	XX
SDPdT2-H	+++	++++	X	X
SDPdT5-H	++++	++++	X	X
SEsmT2-H	+++	++++	X	X
SEsmT5-H	++++	++++	X	X
SDPdT2-AE	+++	++++	+++	X
SDT5-AE	++++	++++	X	X
SEsmT2-AE	+++	++++	X	X
SEsmT5-AE	+++	++++	X	X
SDPdT2-B	++++	++++	+++	X
SDPdT5-B	++	++++	+++	X
SEsmT2-B	+++	++++	X	X
SEsmT5-B	++++	++++	+++	+++
SDPdT2-A	++++	++++	++++	++++
SDPdT5-A	++++	++++	++++	++++
SEsmT2-A	+++	++++	++++	++++
SEsmT5-A	++++	++++	++++	++++

++++= Muy soluble; +++= Soluble; X= Baja solubilidad y XX = Insoluble. EE= Extracto etanólico concentrado; H=Fracción de hexano; AE= Fracción de acetato de etilo; B= Fracción de butanol; A= Fracción acuosa; SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*; SEsm= Sustrato estéril sin micelio; T2, T5= Tratamientos.

En la Figura 18, se muestra el aspecto visual que presentaron algunas muestras en cuanto a la prueba de solubilidad, evaluada como insoluble, de baja solubilidad y soluble.



**Figura 18.** Prueba visual de solubilidad de algunas fracciones de los extractos etanólicos concentrados de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5. (A) Insoluble; (B) Baja solubilidad; (C) Soluble. **Fuente:** propiedad de la autora del presente estudio.

#### **7.4 Efecto de las fracciones de los extractos etanólicos concentrados de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, en los porcentajes de mortalidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus***

La confrontación *in vitro* realizada para evaluar la inhibición de la motilidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus* en las fracciones obtenidas de los EE concentrados de los SD de *P. djamor* y SEsm, de T2 y T5, permitió determinar el efecto nematicida de las fracciones en cuanto al %ML<sub>3</sub>, comparando los resultados con los correspondientes EE concentrados (SDPd-EE y SEsm-EE) de T2 y T5 (Cuadros 10-11). Los SD de *P. djamor* presentaron intervalos de mortalidad del 28.25 al 90.25% (T2) y del 41.75 al 79.50% (T5). El Cuadro 10, muestra los promedios de los %ML<sub>3</sub> del SD de *P. djamor* de T2 y T5, en ambos tratamientos se encontraron diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ). De manera general, los %ML<sub>3</sub> más altos se observaron con las fracciones de H y AE, y los más bajos con B y A. En T2, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el SDPd-EE y las fracciones; mientras que en T5, el SDPd-EE y la fracción de B, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). La prueba F del análisis estadístico también mostró diferencias entre los valores de T2 (16.01) y T5 (320); el valor más alto (T5) indicó mayor variabilidad entre las medias de los grupos evaluados; por lo que T2 presentó menor variación o dispersión de los porcentajes promedios de mortalidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus*. En este experimento se demostró que el SDPd de T2, mostró mayor efecto letal sobre larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* a diferencia de T5. En cuanto al SEsm, el intervalo en los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* en T2 fue del 64.25 al 90.75% y del 43.50 al 71.0% en T5 (Cuadro 11), observando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (T2 y T5), así como entre las fracciones con los SEsm-EE. En T2, el EE concentrado fue el que mostró el %ML<sub>3</sub> más alto ( $90.75 \pm 3.50$ ); mientras que en T5, fue la fracción de H ( $71.0 \pm 2.58$  %). Las fracciones de H y AE, en T2 y T5, no presentaron diferencias estadísticas

( $p>0.05$ ), al igual, el SEsm-EE, no presentó diferencia estadística ( $p>0.05$ ) con dichas fracciones. Las fracciones de B y A, presentaron los %ML<sub>3</sub> más bajos, tanto en T2 como en T5, igual como fue observado en el SD de *P. djamor*. La prueba F del análisis estadístico, mostró diferencias entre T2 (8.21) y T5 (540.4) del SEsm; el valor más alto (T5) indicó mayor variabilidad entre las medias de los grupos evaluados, por lo que T2 presentó menor variación o dispersión en los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* promedios, y fue T2 el que mostró mayor efecto letal sobre las L<sub>3</sub> de *H. contortus* en comparación con T5, mismo efecto fue observado con el SD de *P. djamor*.

**Cuadro 10.** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* confrontadas *in vitro* contra el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL<sup>-1</sup> n =6, 72 h, 28 °C) del SD de *P. djamor* de T2 y T5, así como del grupo testigo.

EE/fracciones/grupo testigo	T2 (%)	T5 (%)
<b>SDPd-EE</b>	75.05±3.65c	55.75±4.27d
<b>SDPd-H</b>	90.25±3.50a	68.50±6.35c
<b>SDPd-AE</b>	84.50±2.08b	79.50±2.08b
<b>SDPd-B</b>	28.25±3.5e	57.50±5.56d
<b>SDPd-A</b>	61.00±3.65d	41.75±4.85e
<b>AGUA</b>	1.50±0.01f	1.75±0.95f
<b>TWEEN-80</b>	2.00±0.81f	1.50±0.57f
<b>IVM</b>	98.25±0.25a	98.25±0.95a
<b>ESTADISTICA</b>	F (7,24) =16.01; Tukey, p<0.05	F (7,24) =320; Tukey, p<0.05

EE= Extracto etanólico concentrado, H= Fracción de hexano, AE= Fracción de acetato de etilo, B= Fracción de butanol, A= Fracción acuosa, SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*,

IVM= Ivermectina;  $\pm$ = Desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Cuadro 11.** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* confrontadas *in vitro* contra el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) del SEsm de T2 y T5, así como del grupo testigo.

EE/fracciones/grupo testigo	T2 (%)	T5 (%)
SEsm-EE	90.75 $\pm$ 3.50b	66.50 $\pm$ 2.88b
SEsm-H	83.50 $\pm$ 4.20c	71.00 $\pm$ 2.58b
SEsm-AE	85.00 $\pm$ 1.63bc	68.75 $\pm$ 3.50b
SEsm-B	64.25 $\pm$ 3.77e	54.50 $\pm$ 3.41c
SEsm-A	71.75 $\pm$ 2.98d	43.50 $\pm$ 5.19d
AGUA	1.75 $\pm$ 0.95f	2.00 $\pm$ 0.81e
TWEEN-80	2.08 $\pm$ 0.81f	2.00 $\pm$ 0.81e
IVM	98.25 $\pm$ 0.95a	98.25 $\pm$ 0.95a
ESTADISTICA	F (7,24) =8.21; Tukey, p<0.05	F (7,24) =540.4; Tukey, p<0.05

EE= Extracto etanólico concentrado, H= Fracción de hexano, AE= Fracción de acetato de etilo, B= Fracción de butanol, A= Fracción acuosa, SEsm= Sustrato estéril sin micelio; IVM= Ivermectina;  $\pm$ = Desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### 7.4.1 Confrontación *in vitro* de las fracciones con mayor efecto nematocida de SD de *P. djamor* y SEsm y sus respectivos blancos, contra larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*

Las fracciones de H y AE de los SD de *P. djamor* y del SEsm, de T2 y T5, mostraron los mayores %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, por lo que se realizó una segunda confrontación *in vitro* contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* con la finalidad de incluir los

respectivos blancos negativos de H y AE, y comparar con los EE concentrados. La mortalidad de larvas infectantes ( $ML_3$ ) se expresó en porcentajes como en el apartado 7.4. El Cuadro 12, muestra los  $\%ML_3$  de *H. contortus* del SD de *P. djamor* de T2 y T5, y en el Cuadro 13, los correspondientes al SEsm; en ambos casos se encontraron diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ). En T2, los  $\%ML_3$  se registraron por arriba del 90%, mientras que en T5, por debajo del 77% (Cuadro 12); las fracciones de H y AE presentaron los porcentajes más altos, cercanos entre sí en T2, pero no en T5; sin embargo, la fracción de AE mostró los porcentajes de mortalidad más altos, obteniendo  $\%ML_3$  más altos en T2 ( $95.50 \pm 2.08$ ) que en T5 ( $76.25 \pm 2.98$ ). Los EE concentrados, en T2 y T5, registraron los  $\%ML_3$  de *H. contortus* más bajos. En relación a los testigos negativos (Bco de H y Bco de AE), estos presentaron porcentajes de  $ML_3$  entre 1.75 y 2%, los cuales fueron considerados sin diferencias estadísticas (Tukey,  $p > 0.05$ ) en ambos tratamientos (T2 y T5). La prueba F del análisis estadístico, mostró diferencias entre T2 (2795) y T5 (1427); el valor más alto en T2 indicó mayor variabilidad entre las medias de los grupos evaluados, por lo que T5, con el valor más bajo, registró menor variación en los  $\%ML_3$  promedios de *H. contortus*.

En cuanto al SEsm, de T2 y T5 (Cuadro 13), se encontraron diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ) entre las dos fracciones de H y AE, y EE concentrado; entre los grupos testigos negativos (Agua y Tween-80) y los blancos (H y AE), no se registraron diferencias significativas (Tukey,  $p > 0.05$ ), pero sí con el testigo positivo (IVM). La confrontación *in vitro* con el SEsm, demostró que la fracción de AE registró el  $\%ML_3$  más alto en T2 ( $92.25 \pm 2.21$ ) como en T5 ( $71.25 \pm 3.30$ ) (Cuadro 13). Fue notorio que el SEsm-EE mostró mayor mortalidad de larvas  $L_3$  de *H. contortus* que los correspondientes SDPd-EE, de T2 y T5 (Cuadro 12); sin embargo, la actividad AH fue más alta en T2 que en T5. La

prueba F del análisis estadístico, mostró diferencias entre T2 (2887) y T5 (1764); T2 con el valor más alto, indicó mayor variabilidad entre las medias de los grupos evaluados, y T5, con el valor más bajo, menor variación en los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.

**Cuadro 12.** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* en el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) del SD de *P. djamor* de T2 y T5, así como del grupo testigo.

EE/SD/grupo testigo	T2 (%)	T5 (%)
<b>SDPd-EE</b>	75.00±3.65c	56.25±2.98d
<b>SDPd-H</b>	90.25±1.70b	67.75±3.77c
<b>SDPd-AE</b>	95.50±2.08a	76.25±2.98b
<b>AGUA</b>	1.75±0.95d	2.00±0.81e
<b>TWEEN-80</b>	2.00±0.81d	2.25±1.25e
<b>IVM</b>	98.00±1.41a	98.25±0.95a
<b>BCO H</b>	2.00±0.81d	1.75±0.95e
<b>BCO AE</b>	1.75±0.95d	2.00±0.81e
<b>ESTADISTICA</b>	F <sub>(7,24)</sub> =2795; Tukey, p<0.05	F <sub>(7,24)</sub> =1427; Tukey, p<0.05

EE= Extracto etanólico concentrado, H= Fracción de hexano, AE= Fracción de acetato de etilo, B= Fracción de butanol, A= Fracción acuosa, SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*, IVM= Ivermectina; ±= Desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, p< 0.05).

**Cuadro 13.** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* en el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) del SEsm de T2 y T5, así como del grupo testigo.

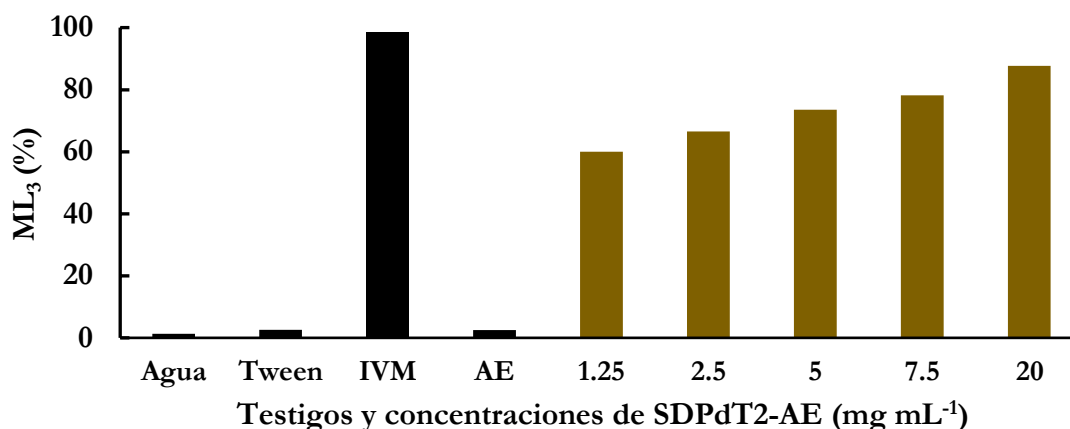
EE/SE/grupo testigo	T2 (%)	T5 (%)
SEsm-EE	88.00±2.58c	60.00±2.58d
SEsm-H	77.25±2.75d	66.00±2.58c
SEsm-AE	92.25±2.21b	71.25±3.30b
AGUA	1.75±0.95e	2.00±0.81e
TWEEN-80	2.00±0.81e	2.25±1.25e
IVM	98.00±1.41a	98.25±0.95a
BCO H	2.00±0.81e	1.75±0.95e
BCO AE	1.75±0.95e	2.00±0.81e
<b>ESTADISTICA</b>	F <sub>(7,24)</sub> =2887; Tukey, p<0.05	F <sub>(7,24)</sub> =1764; Tukey, p<0.05

EE= Extracto etanólico concentrado, H= Fracción de hexano, AE= Fracción de acetato de etilo, B= Fracción de butanol, A= Fracción acuosa, SE= Sustrato estéril; SEsm= Sustrato estéril sin micelio; IVM= Ivermectina; ±= Desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, p < 0.05).

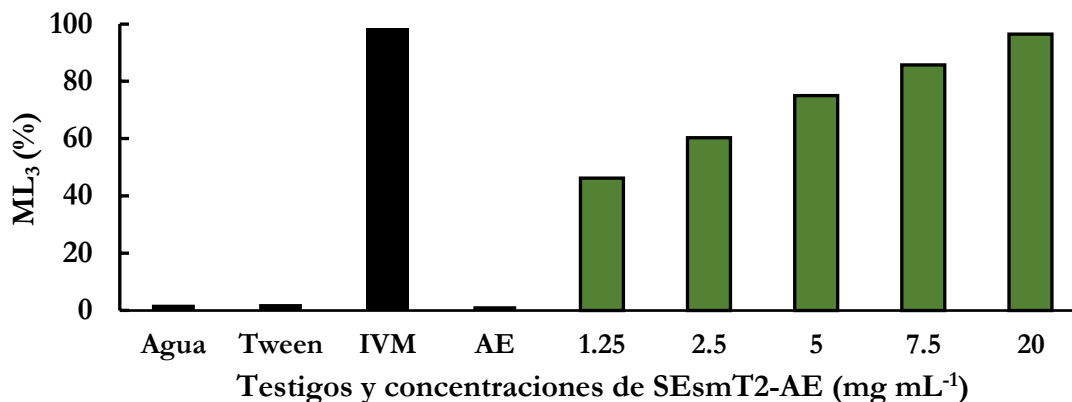
### 7.5 Porcentaje de mortalidad *in vitro* de L<sub>3</sub> de *H. contortus* a diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo de SD de *P. djamor* y SEsm de T2

La confrontación *in vitro* de las fracciones de AE del SD de *P. djamor* y el SEsm del tratamiento T2, seleccionados por presentar los mayores %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, se realizó bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores, determinando de igual forma los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. El efecto nematocida de cinco concentraciones (1.25, 2.5, 5.0, 7.5 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) que presentaron las fracciones de AE de SD-T2 de *P. djamor* y SEsm-T2 sobre larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* se muestra en las Figuras 19 y 20. El análisis estadístico

demostró diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones evaluadas tanto en el SDPd como en el SEsm. De manera general se encontró que al aumentar la concentración de 1.25 a 20 mg mL<sup>-1</sup>, el %ML<sub>3</sub> en el SDPdT2-AE, se incrementó de 59.08±1.37 a 89.41±4.35 %; mientras que con el SEsmT2-AE, el incremento fue de 46.83±2.03 a 96.91±3.0 %. Estos resultados demostraron que el SEsmT2-AE a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, mostró mayor efecto nematicida que el SDPdT2-AE a la misma concentración. Los valores de la prueba de F en el análisis estadístico fueron de 3196 (SDPd) y 5109 (SEsm), e indicaron que mientras más dispersas estuvieron las medias de los grupos evaluados, mayor fue su valor.



**Figura 19.** Efecto de los grupos testigo y diferentes concentraciones de la fracción de SDT2-AE de *P. djamor* en el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.

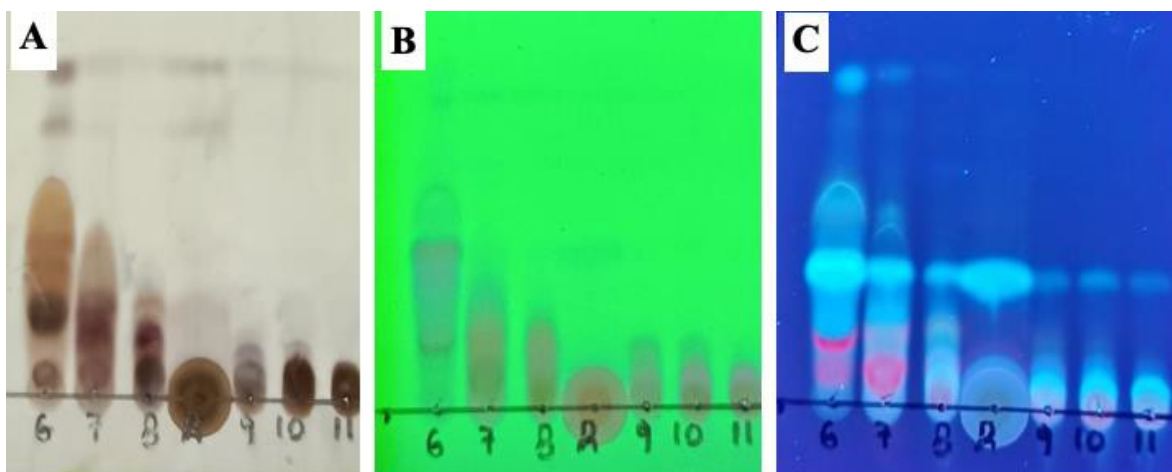


**Figura 20.** Efecto de los grupos testigo y diferentes concentraciones de la fracción de SEsmT2-AE en el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.

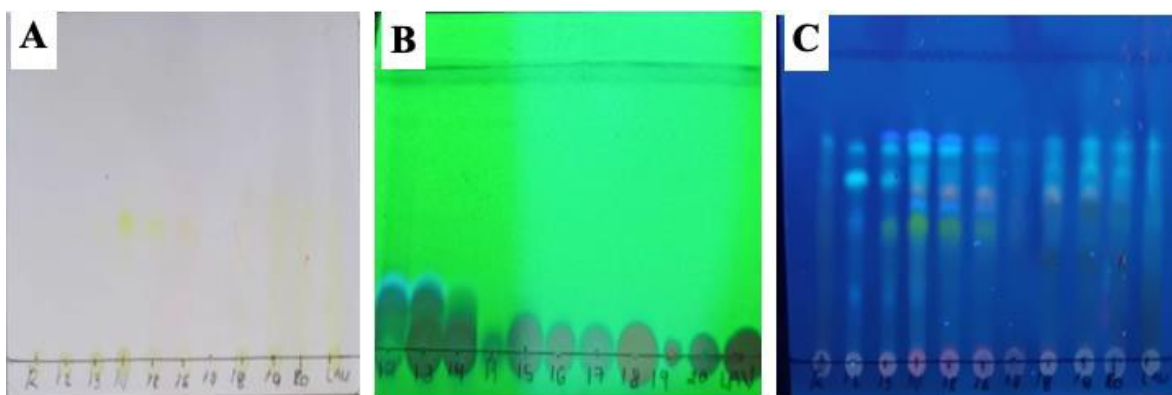
### 7.6 Reuniones y perfiles cromatográficos obtenidos del estudio micoquímico y biodirigido de la fracción de acetato de etilo de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2

Del fraccionamiento realizado por cromatografía en columna (C) a las fracciones de AE del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, se colectaron un total de 22 fracciones del SDPdT2-AEC y 23 del SEsmT2-AEC. De las fracciones colectadas y corridas por separado en cromatografía en placa fina (CPF), se obtuvieron para el SDPdT2-AEC, las reuniones “R2”, “R3”, “R4”, “R5” y “R6”, así como la muestra de referencia (MR), y para el SEsmT2-AEC, “R2”, “R3”, “R5”, “R8” y su MR. Las Figuras 21-24 muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las fracciones colectadas en columna, a partir de las cuales se juntaron las reuniones seleccionadas con un mismo Rf. Las manchas de las placas fueron visualizadas con sulfato cérico (CeSO<sub>4</sub>) como revelador y luz UV. Para los perfiles cromatográficos por CPF de las reuniones 9-13 del SDPdT2-AEC (“R4”) se usó un sistema de elución 70:30 hexano:acetato de etilo (Figura 21); para las reuniones 17-20 (“R6”) de SDPdT2-AEC se utilizó 100% de diclorometano y revelador para flavonoides (Figura 22); para las reuniones 7-8 (“R3”) del

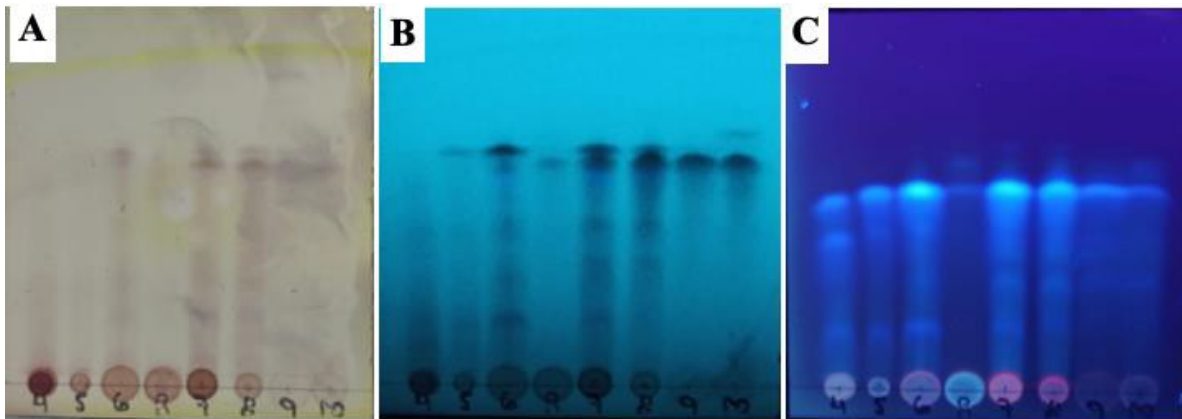
SEsmT2-AEC, se usó un sistema de elución de agua -acetonitrilo (50:50) (Figura 23); para las reuniones 12-15 (“R5”) del SEsmT2-AEC, el sistema de elución fue agua: acetonitrilo (50:50) (Figura 24).



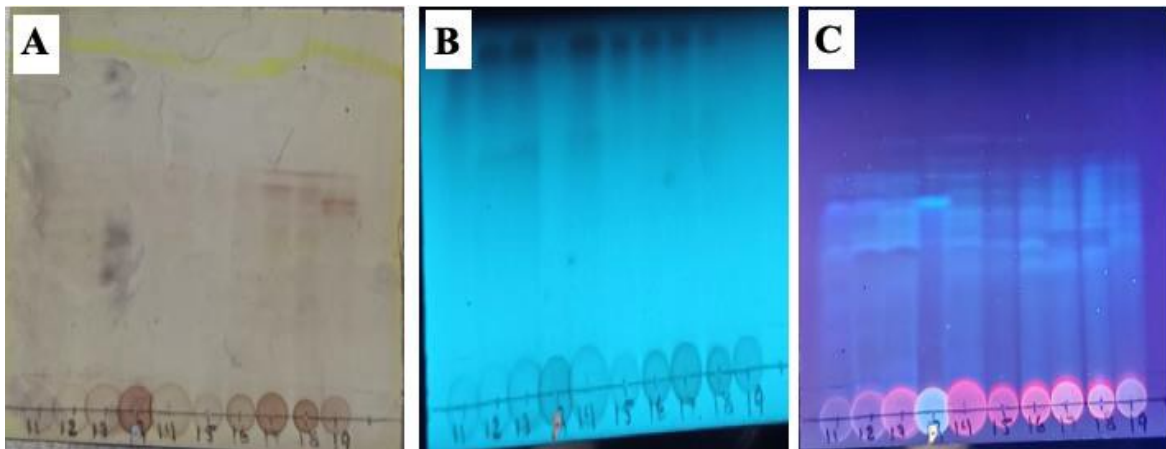
**Figura 21.** Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 9-13 del SDT2-AEC (“R4”) de *P. djamor* obtenidas en un sistema de elución 70:30 hexano: acetato de etilo. (A) Revelador de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C:365 nm).



**Figura 22.** Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 17-20 de SDT2-AEC (“R6”) de *P. djamor* obtenidas con diclorometano al 100%. (A) Revelador para flavonoides; Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C: 365 nm).



**Figura 23.** Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 7-8 del SEsmT2-AEC (“R3”), obtenidas en un sistema de elución: agua-acetonitrilo (50:50). (A) Revelador de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C:365 nm).



**Figura 24.** Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 12-15 de SEsmT2-AEC (“R5”), obtenidas en un sistema de elución: agua:acetonitrilo (50:50). (A) Revelador de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C: 365 nm).

### 7.6.1 Porcentaje de mortalidad *in vitro* de L<sub>3</sub> de *H. contortus* de las reuniones obtenidas por CPF de SDT2-AEC de *P. djamora* y SEsmT2-AEC

En esta evaluación *in vitro* se utilizaron un total de nueve reuniones (“R”) obtenidas de SDT2-AEC(“R”) de *P. djamora* y SEsmT2-AEC(“R”) incluyendo las MR respectivas de cada sustrato, así como los controles negativos y positivo correspondientes con el fin de evaluar el efecto nematicida sobre larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*. En el Cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos de los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* del SDT2-AEER de *P. djamora* y del SEsmT2-AEER. En cuanto al SDPdT2-AEER, en los %ML<sub>3</sub>, la reunión “R6” mostró mayor actividad AH ( $97\pm 1.88$ ), seguido de la reunión “R4” ( $95.20\pm 1.98$ ); la MR mostró un porcentaje intermedio de AH (ML<sub>3</sub>) contra *H. contortus* entre estas dos ( $96.8\pm 1.39$ ); las reuniones “R2”, “R3” y “R5”, mostraron porcentajes de AN *in vitro* en un intervalo de  $82.20\pm 2.20$  a  $84.31\pm 2.05$ . Para el SEsmT2-AEER (Cuadro 14), las reuniones “R3” y “R5” mostraron los porcentajes más altos ( $96.40\pm 1.57$  y  $96\pm 1.39$ , respectivamente) de ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, mientras que la reunión “R8” registró el porcentaje más bajo ( $79.60\pm 3.89$ ); la MR y la “R2” mostraron %ML de  $91.70\pm 1.15$  y  $87.30\pm 1.76$ , respectivamente. Se observó que con el SEsmT2-AEC se obtuvo mayor diferencia entre los diferentes porcentajes promedios de AN que con el SDT2-AEC de *P. djamora*, lo anterior se relacionó con los valores de la prueba F obtenidos en el análisis estadístico en el %ML<sub>3</sub>, 4685 para el SDPdT2 y 5747 para el SEsmT2; el valor más alto representó mayor dispersión o variabilidad en las medias del grupo evaluado.

**Cuadro 14.** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* de las reuniones (5 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) obtenidas por CPF de la fracción de AE de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, colectadas en columna.

<b>Reuniones y blancos</b>	<b>SDPd</b>	<b>SEsm</b>
<b>“R2”</b>	82.20±2.20b	87.30±1.76c
<b>“R3”</b>	84.31±2.05b	96.40±1.57a
<b>“R4”</b>	95.20±1.98a	-
<b>“R5”</b>	83.30±4.16b	96.00±1.05a
<b>“R6”</b>	97.00±1.88a	-
<b>“R8”</b>	-	79.60±3.89d
<b>MR</b>	96.8±1.39a	91.70±1.15b
<b>Bco. AE</b>	2.20±1.03c	2.00±1.05e
<b>TWEEN-80</b>	2.41±0.96c	2.60±1.26e
<b>AGUA</b>	2.07±0.94c	2.20±1.03e
<b>IVM</b>	97.90±0.99a	97.90±0.99a
<b>ESTADISTICA</b>	F <sub>(9,90)</sub> =4685; Tukey, p<0.05	F <sub>(8,81)</sub> =5847; Tukey, p<0.05

IVM= Ivermectina; %ML<sub>3</sub>= Porcentaje de mortalidad de larvas infectantes; Bco. AE= Blanco de acetato de etilo; SDPd= Sustrato degradado de *P. djamor*; ±= Desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, p < 0.05).

Con base en los resultados obtenidos de la confrontación *in vitro* de las reuniones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, se seleccionaron cuatro reuniones: dos de SDPdT2-AEcr y dos de SEsmT2-AEcr, éstas mostraron los porcentajes más altos de larvas muertas L<sub>3</sub> de *H. contortus*. En el Cuadro 15, se muestra un resumen de estas cuatro reuniones, la dos de SDPdT2-AEC (SDPdT2-AEcr4 y SDPdT2-AEcr6) y las dos de SEsmT2-AEC (SEsmT2-AEcr3 y SEsmT2-

AECR5) mostrando los sistemas de elución usados en CPF. De estas reuniones, se tomaron 0.015g para su posterior análisis en CG-EM.

**Cuadro 15.** Reuniones obtenidas por CPF a partir de las fracciones colectadas por cromatografía en columna fase reversa del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2.

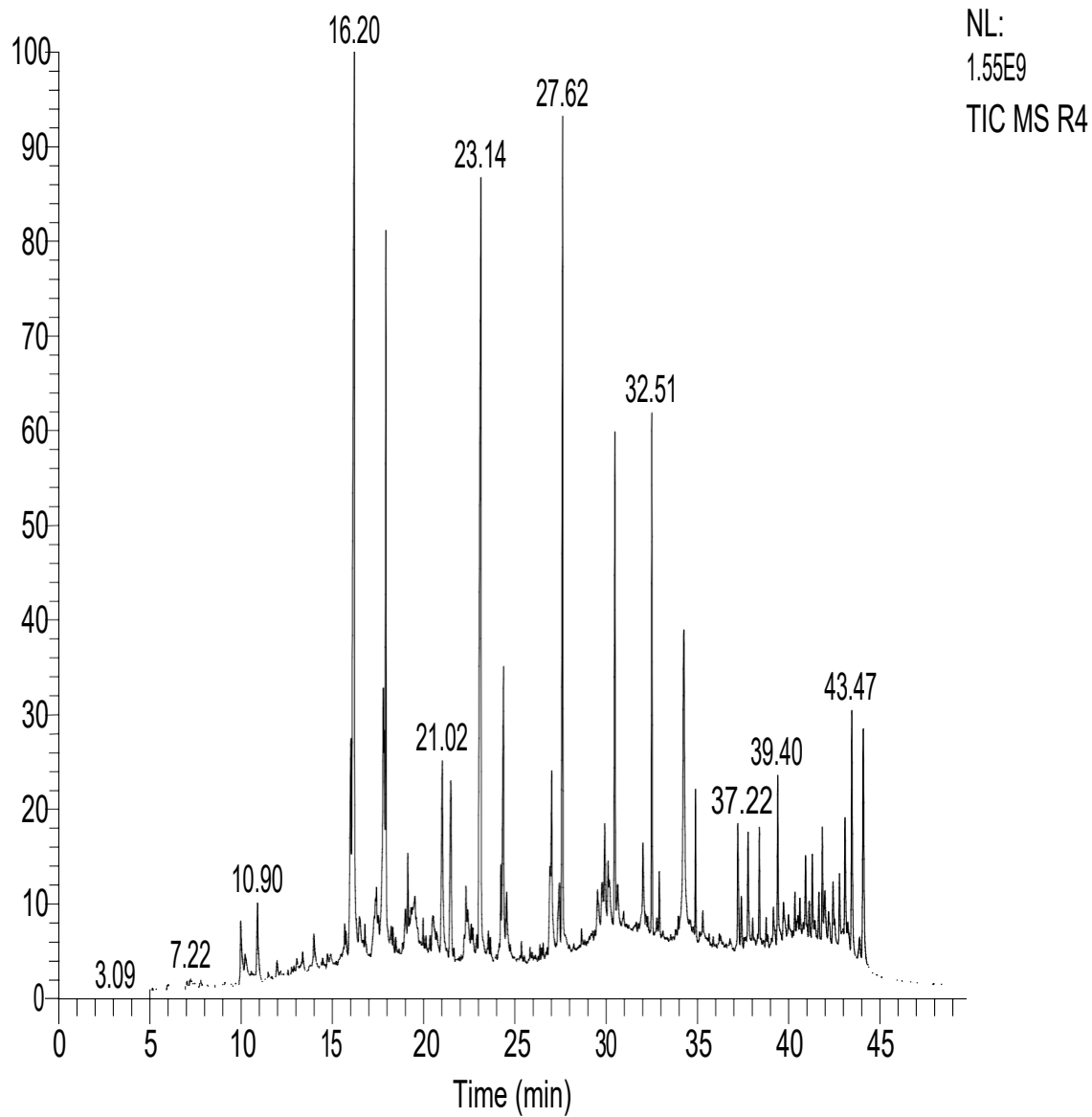
Fracción	Sistema de elución	Reuniones (CPF)	Clave
SDPdT2-AEC	Hexano:Acetato de etilo (70:30 v:v)	9-13	“R4”
SDPdT2-AEC	Diclorometano (100%)	17-20	“R6”
SEsmT2-AEC	Agua-Acetonitrilo (50/50 v: v)	7-8	“R3”
SEsmT2-AEC	Agua: acetonitrilo (50/50 v: v)	12-15	“R5”

SDPdT2-AEC= Fracción de acetato de etilo colectada en columna de sustrato degradado de Pd de T2; SEsmT2-AEC= Fracción de acetato de etilo colectada en columna de sustrato estéril sin micelio de T2.

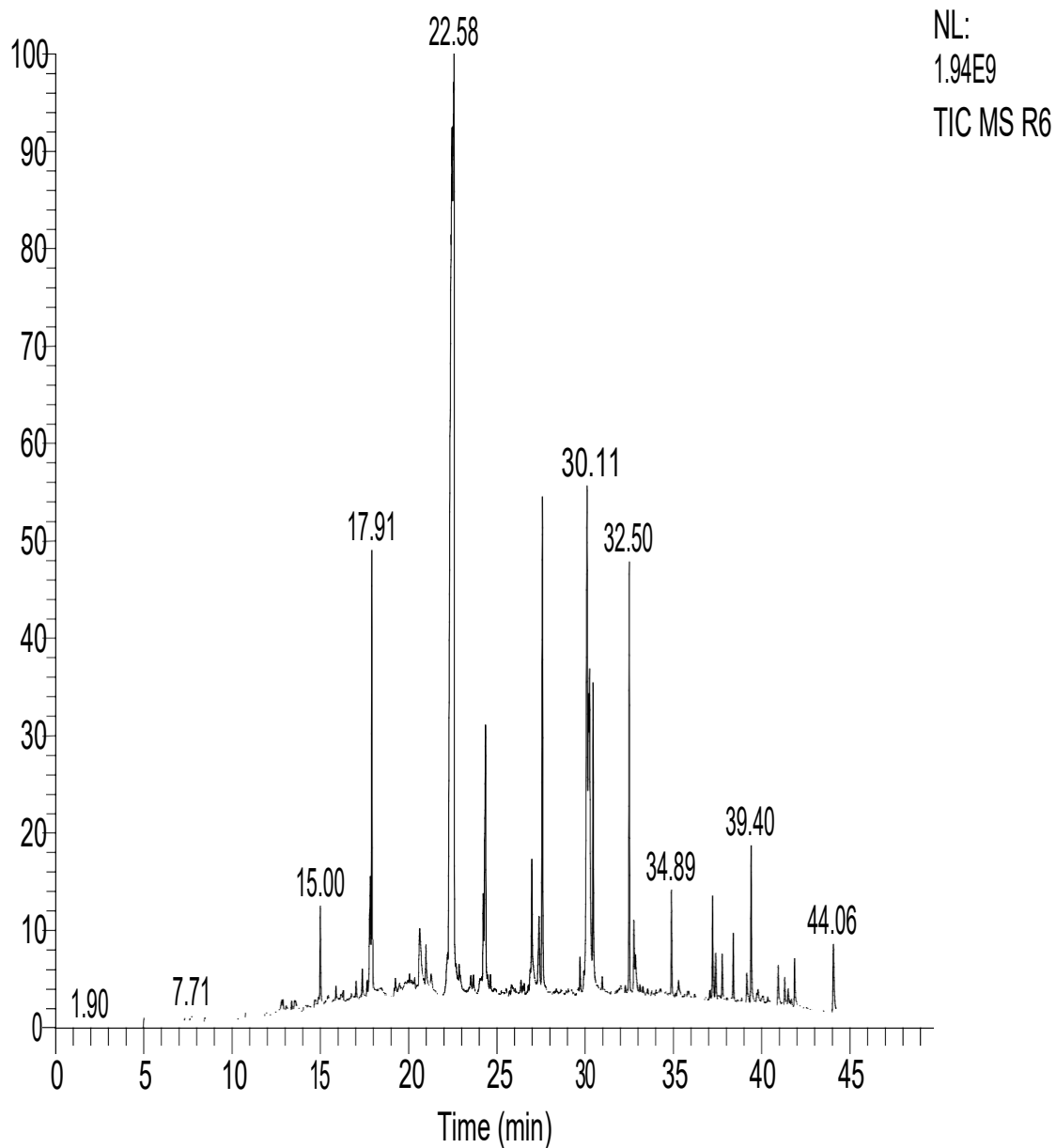
### 7.7 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de las reuniones de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2-AECR que mostraron alta actividad nematocida contra L<sub>3</sub> de *H. contortus*

En las Figuras 25-26, se muestran los cromatogramas obtenidos por CG-EM de las reuniones de SDT2-AECR de *P. djamor* y en las Figuras 27-28 de SEsmT2-AECR, seleccionadas por su alta AN, expresada en %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. Los cromatogramas muestran picos definidos y separados con base en el tiempo de retención (TR) y mostrando la abundancia relativa en base 100 de cada pico. Como puede observarse en las Figuras 25-26, los cromatogramas de SDPd presentan mayor número de picos que los de SEsm (Figuras 27-28). En las Figuras 29-30, se muestran los estándares de referencia obtenidos por CG-EM para cada reunión de SDT2-AECR de *P. djamor* y en las Figuras 31-32, de los del SEsmT2-AECR, mostrando de igual manera, picos definidos y separados por su

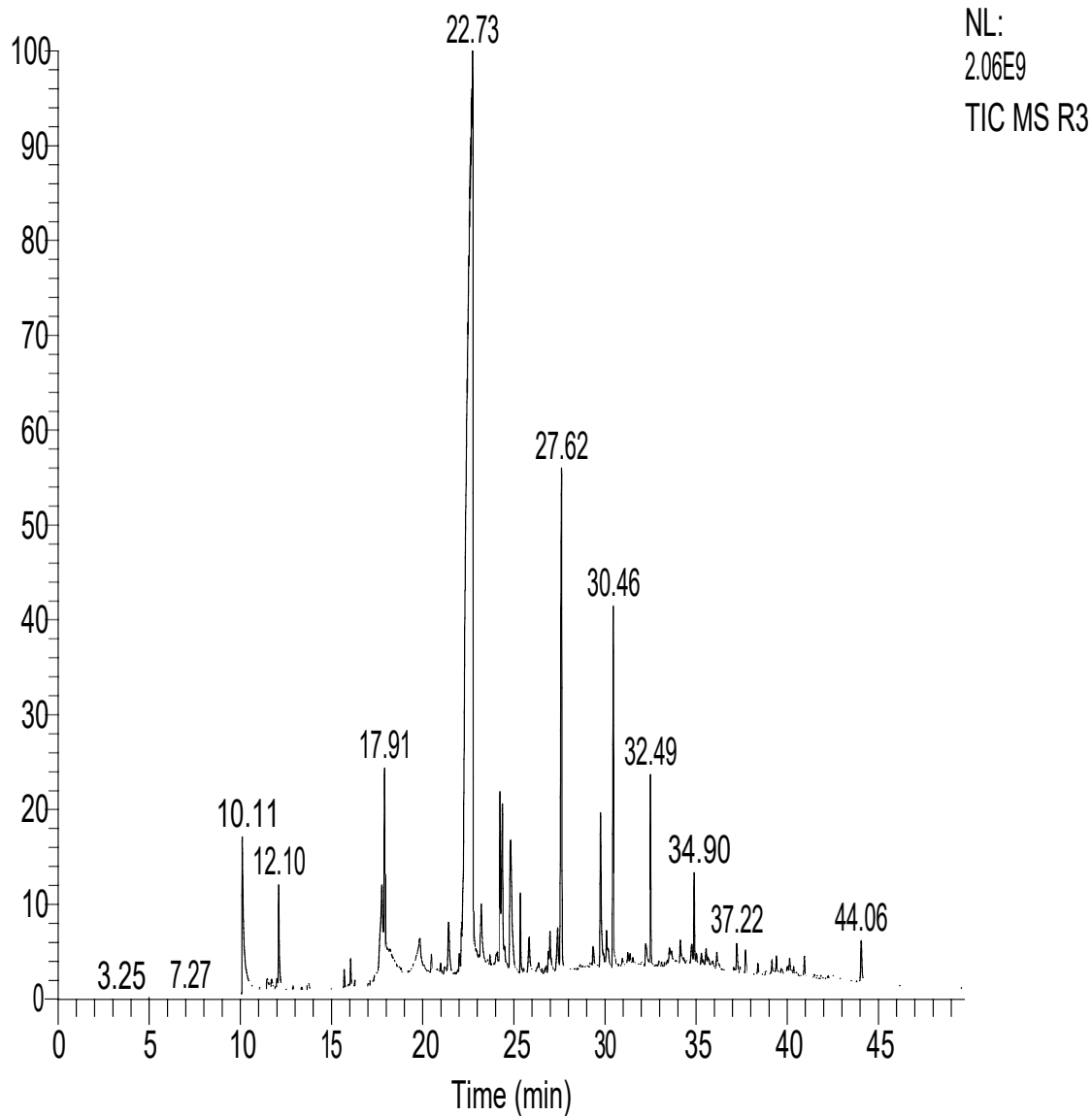
TR, y la abundancia relativa en base 100. En los Cuadros 16 al 19 se muestran con base a los espectros de masas, los compuestos químicos identificados con base a su TR (minutos), Masa Molecular (MM) ( $\text{g mol}^{-1}$ ), Abundancia Relativa (AR) (%) y estructura química de los compuestos correspondientes, de las reuniones de SDPdT2-AECR y de SEsmT2-AECR. En la “R4” sobresalieron compuestos de naturaleza fenólica como Alcohol 3,4-dimetoxibencílico, 5,6 Dimetoxi benzofuranona-1(3H), 5-Hidroxi-1,3-dimetillidolinona-2; en la “R6”, Cafeína y 2,2,4 Trimetil-1,3 pentanediol diisobutirato; en las dos reuniones se encontraron ácidos grasos como Hexadecanamida, Octadecanamida y 9-Octadecanamida, así como Ftalato de diisooctilo. En los SEsmT2, en la reunión “R3” (SEsmT2-AEC-R3) se identificaron mayor número de compuestos químicos a diferencia de la reunión “R5” (SEsmT2-AEC-R5); encontrando metabolitos de naturaleza fenólica (2,3-Dihidrobencofurano, 2-Metoxi-4-vinilfenol y Cafeína), ácidos grasos (Ácido n-hexadecanoico, Hexadecanamida, y Octadecanamida), Phthalatos y Nandrolona (“R3”); y en “R5”, Cafeína, Ftalato de dibutilo, Hexadecanamida, Octadecanamida, y Tereftalato de bis(2-etilhexilo).



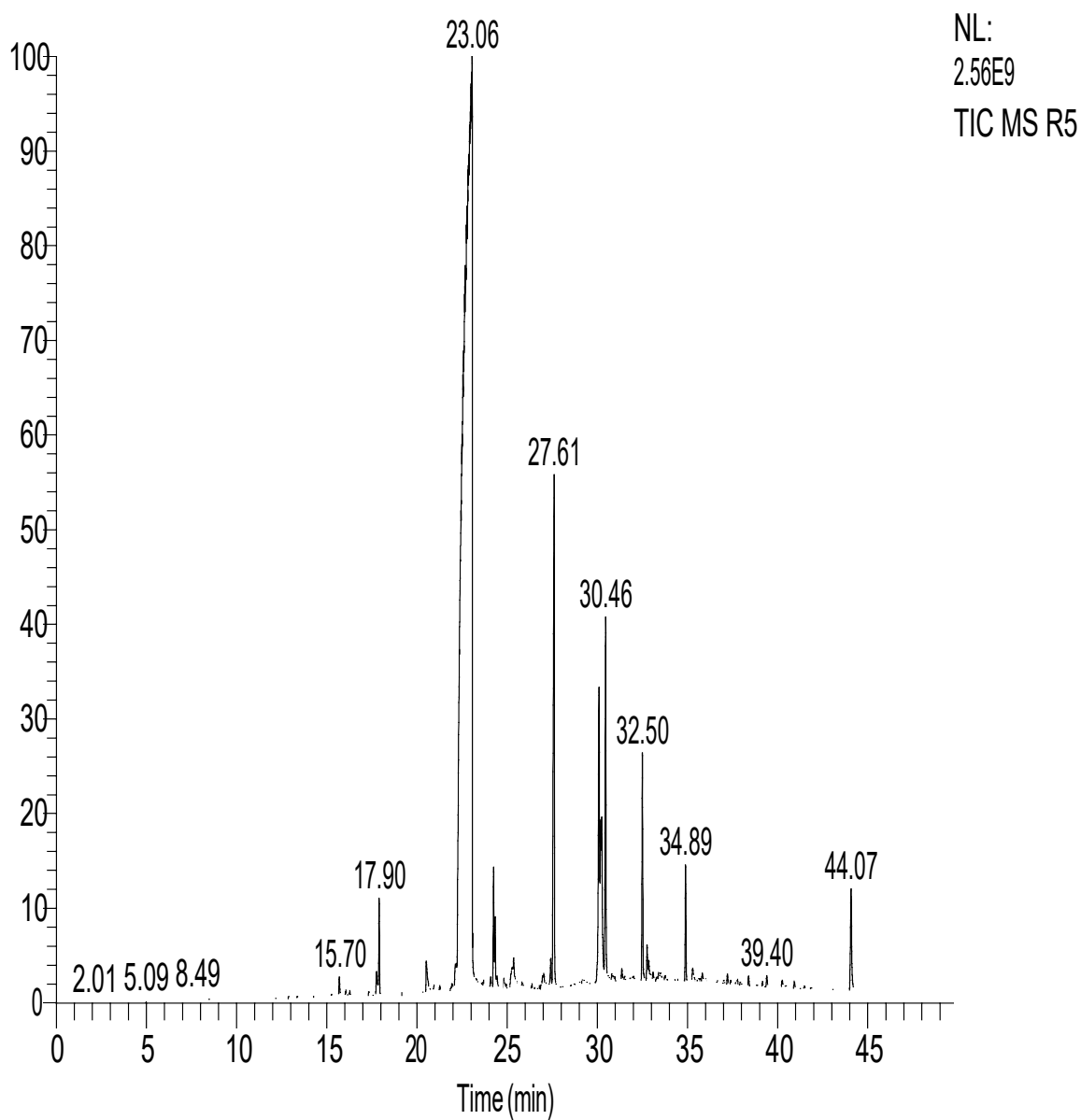
**Figura 25.** Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R4” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SDT2 de *P. djamor*. Clave: SDPdT2-AEC-R4.



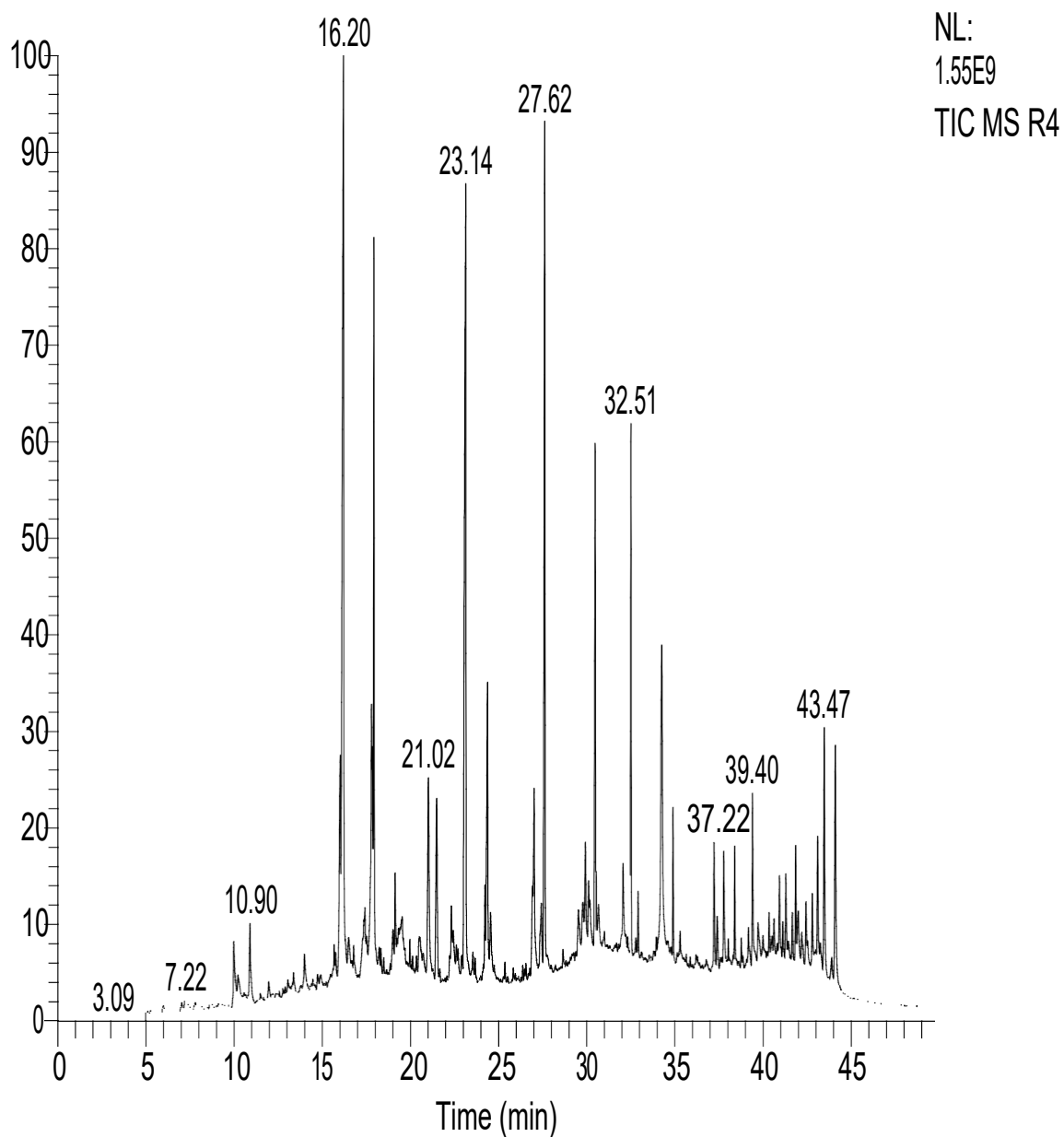
**Figura 26.** Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R6” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SDT2 de *P. djamor*. Clave: SDPdT2-AEC-R6.



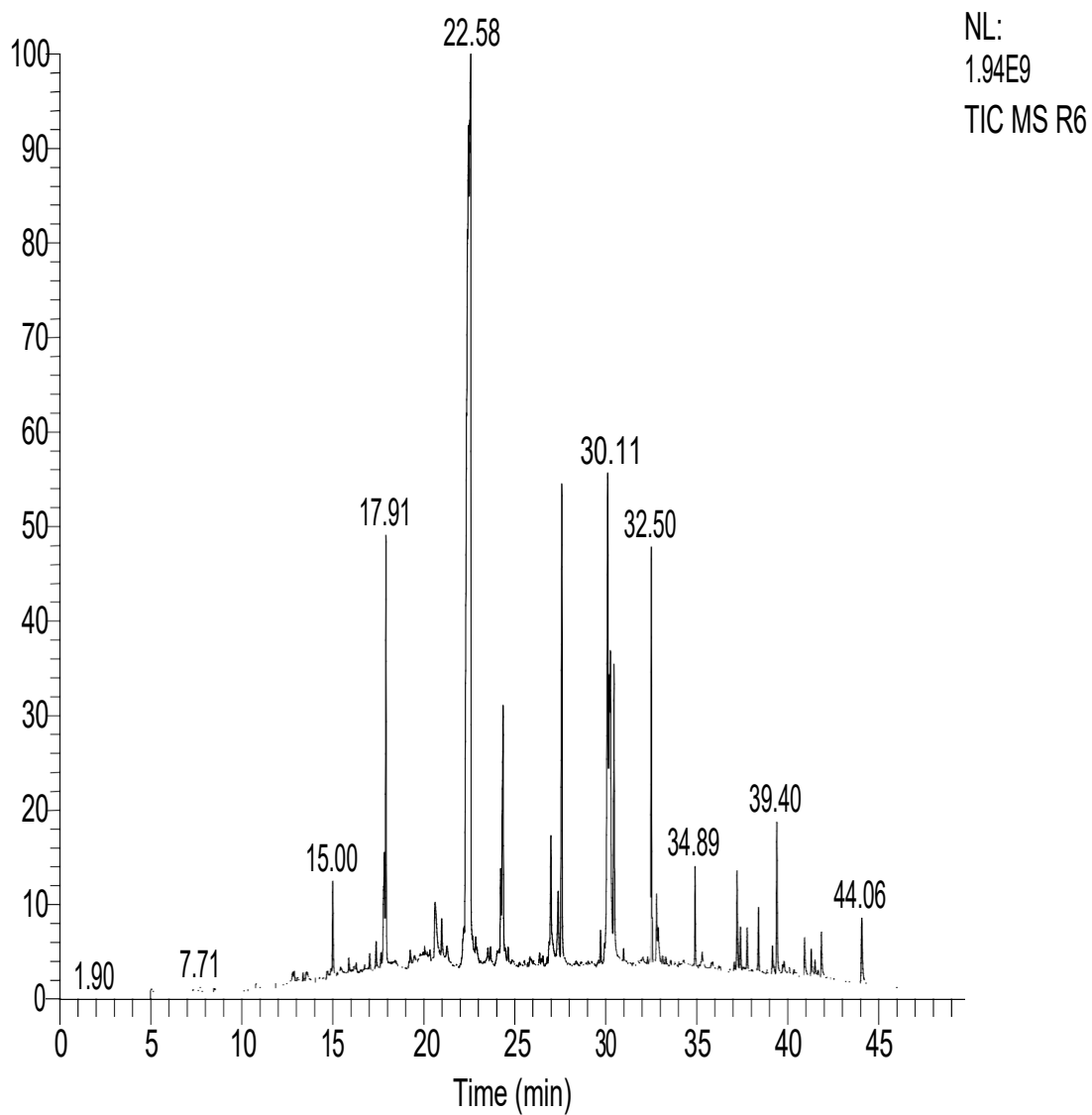
**Figura 27.** Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R3” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SEsmT2. Clave: SEsmT2-AEC-R3.



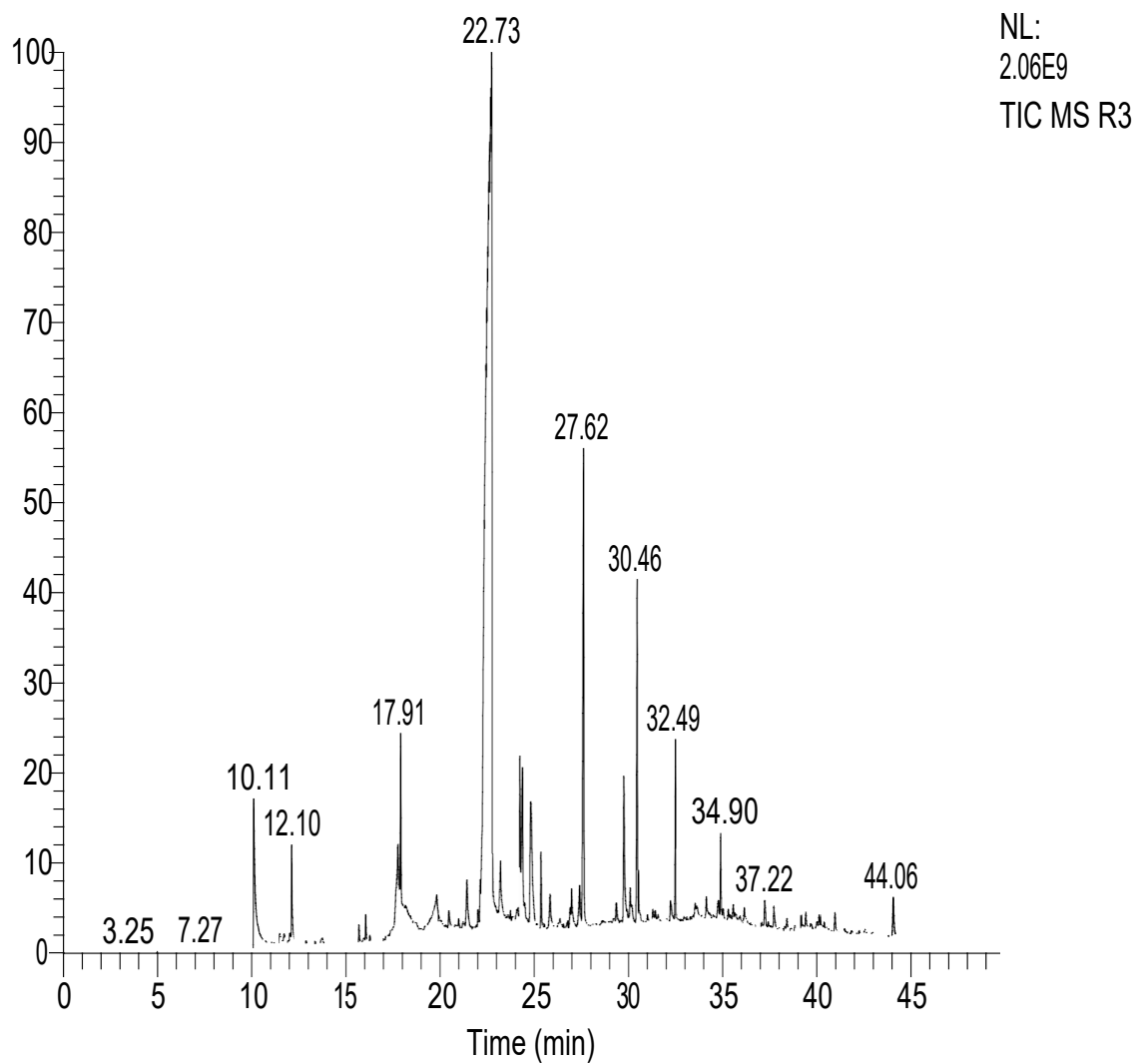
**Figura 28.** Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R5” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SEsmT2. Clave: SEsmT2-AEC-R5.



**Figura 29.** Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R4” (SDPdT2-AEC-R4) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SDT2 de *P. djamor*.

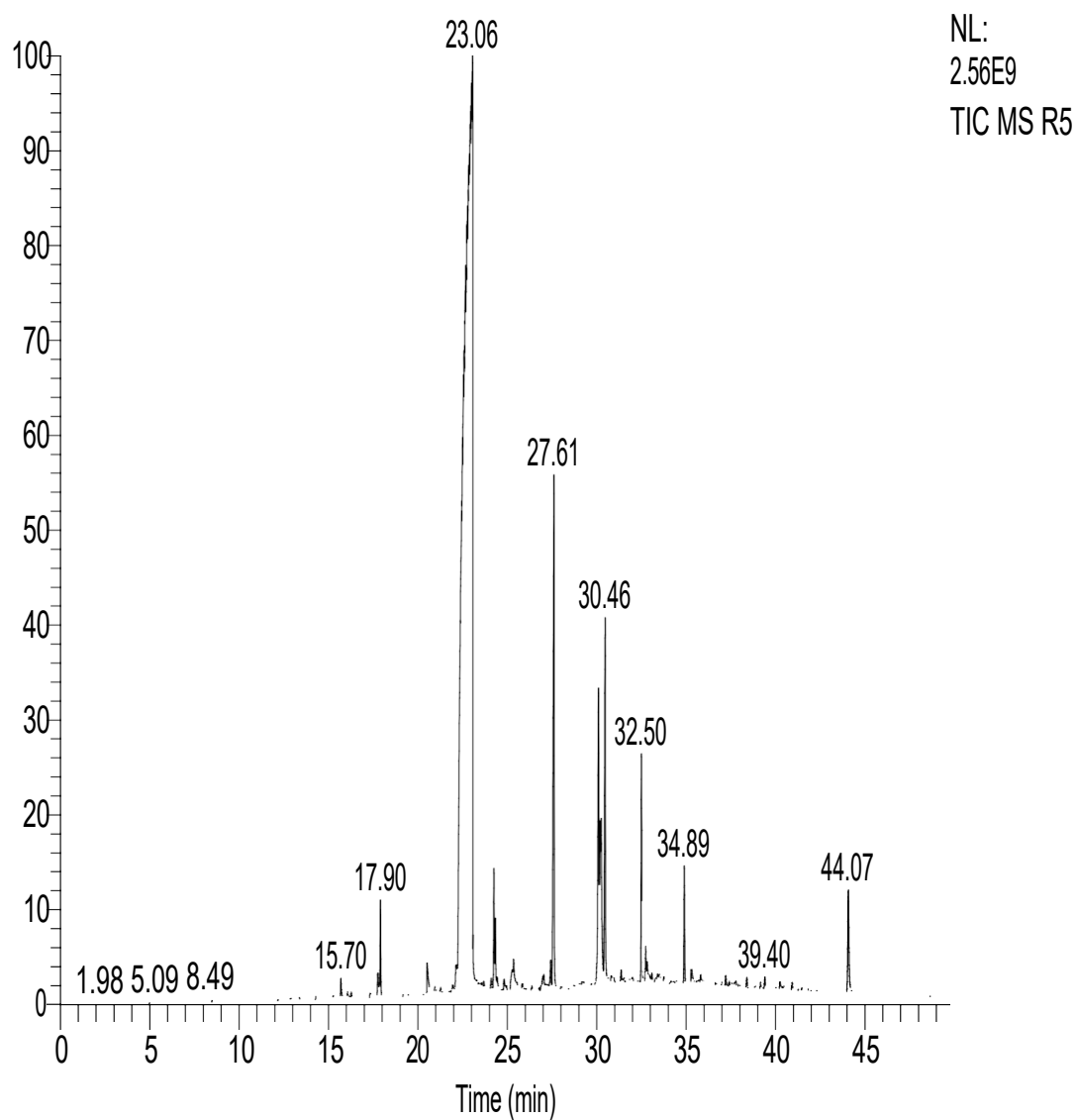


**Figura 30.** Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R6” (SDPdT2-AEC-R6) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SDT2 de *P. djamor*.



**Figura 31.** Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R3” (SEsmT2-AEC-R3) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SEsmT2 de *P. djamor*.

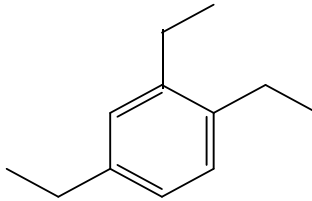
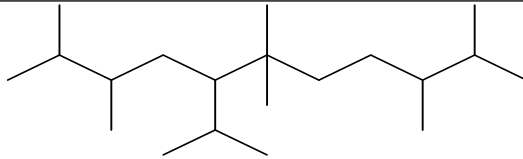
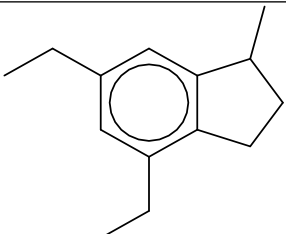
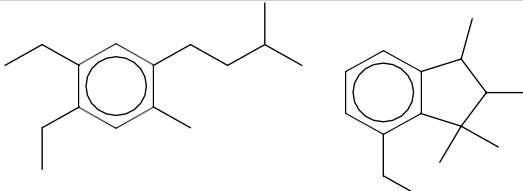
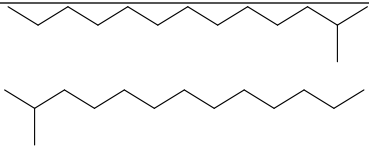
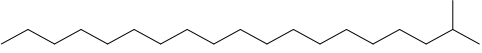


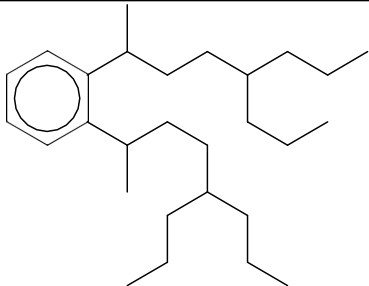
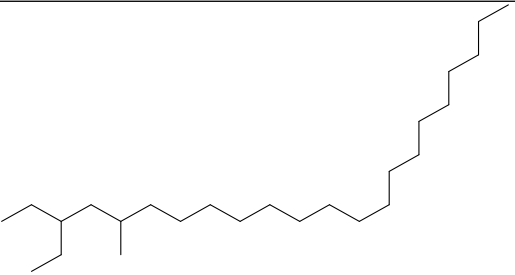


**Figura 32.** Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R5” (SEsmT2-AEC-R5) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SEsm-T2.



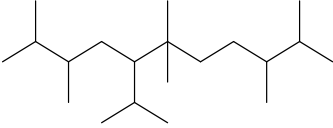
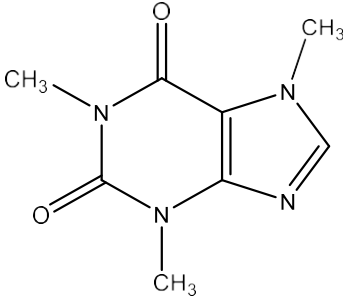
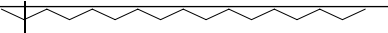
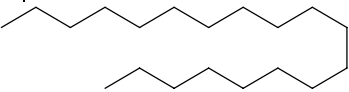
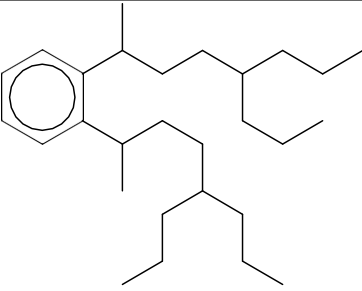
**Cuadro 16.** Compuestos elucidados por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la reunión de SDT2-AEC-R4 de *P. djamor*.

Pico	Compuesto	TR (min)	AR (%)	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Estructura química
1	Alcohol 3,4-dimetoxibencílico	16.20	99	168.19	
2	2,2,4-trimetil-1,3-pentanol-diisobutirato	17.92	80	286.41	
3	5,6-Dimetoxi-isobenzofuranona	23.14	89	194.18	
4	5-Hidroxi-1,3-dimetilindolinona-2	24.50	33	177.20	
5	Hexadecanamida	27.62	91	255.44	
6	Octadecanamida	30.47	53	283.5	

7	<b>Ftalato de diisooctilo</b>	32.51	59	390.6	
8	<b>Ester 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etilico del ácido dodecanoico</b>	34.25	33	274.40	

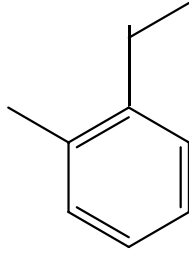
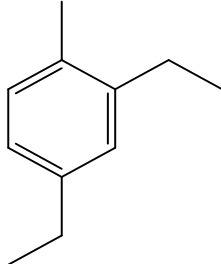
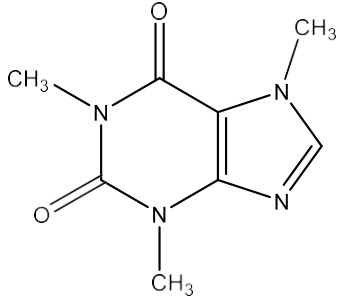
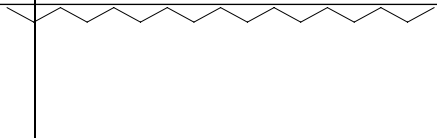
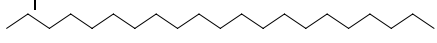
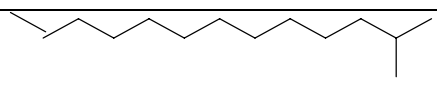
TR= Tiempo de retención; AR= Abundancia relativa; MM= Masa molecular.

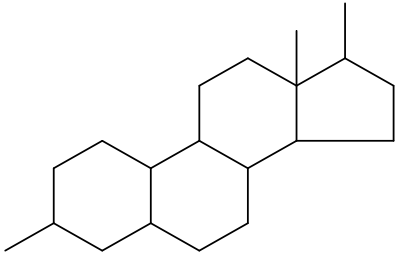
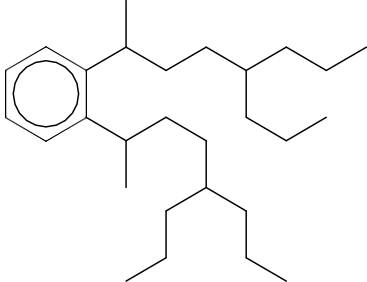
**Cuadro 17.** Compuestos elucidados por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la reunión de SDT2-AEC-R6 de *P. djamor*.

Pico	Compuesto	TR (min)	AR (%)	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Estructura química
1	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	17.91	48	286.41	
2	Cafeína	22.46	99	194.19	
3	Hexadecanamide	27.58	56	255.44	
4	9-Octadecenamide, (Z)-	30.11	50	281.47	
5	Diisooctyl phthalate	32.50	48	390.55	

TR= Tiempo de retención; AR= Abundancia relativa; MM= Masa molecular.

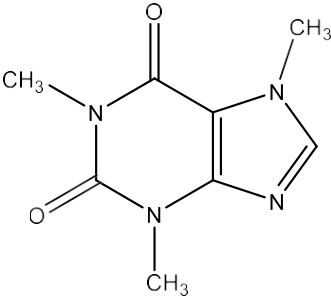
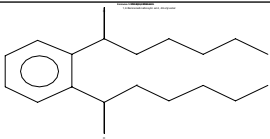
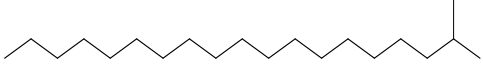
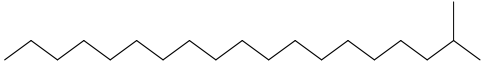
**Cuadro 18.** Compuestos elucidados por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la reunión de SEsmT2-AEC-R3.

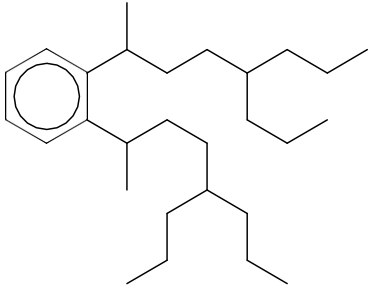
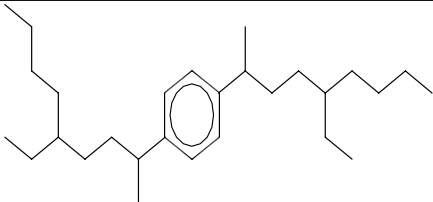
Pico	Compuesto	TR (min)	AR (%)	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Estructura química
1	2,3-Dihidrobenzofurano	10.11	16	120.1	
2	2-Metoxi-4-vinilfenol	12.10	12	150.17	
3	Cafeína	22.73	98	194.19	
4	Ácido n-hexadecanoico ó ácido palmítico	24.38	21	256.4	
5	Hexadecanamida	27.62	56	255.4	
6	Octadecanamida	30.46	42	283.5	

7	Nandrolona	32.23	19	274.4	
8	Phthalates Diisooctyl phthalate	32.49	18.63	164.11	

TR= Tiempo de retención; AR= Abundancia relativa; MM= Masa molecular.

**Cuadro 19.** Compuestos elucidados por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la reunión de SEsmT2-AEC-R5.

Pico	Compuesto	TR (min)	AR (%)	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Estructura química
1	Cafeína	23.06	99	194.19	
2	Ftalato de dibutilo o dibutil ftalato	24.25	12	278.34	
3	Hexadecanamida	27.60	53	255.44	
4	Octadecanamida	30.46	41	283.5	

5	Ftalato de diisooctilo	32.50	30	390.56	
6	Éster 2-metil-1,4-bis(2-etilhexílico) del ácido 1,4-benzenodicarboxílico	34.90	27	390.6	

TR= Tiempo de retención; AR= Abundancia relativa; MM= Masa molecular.

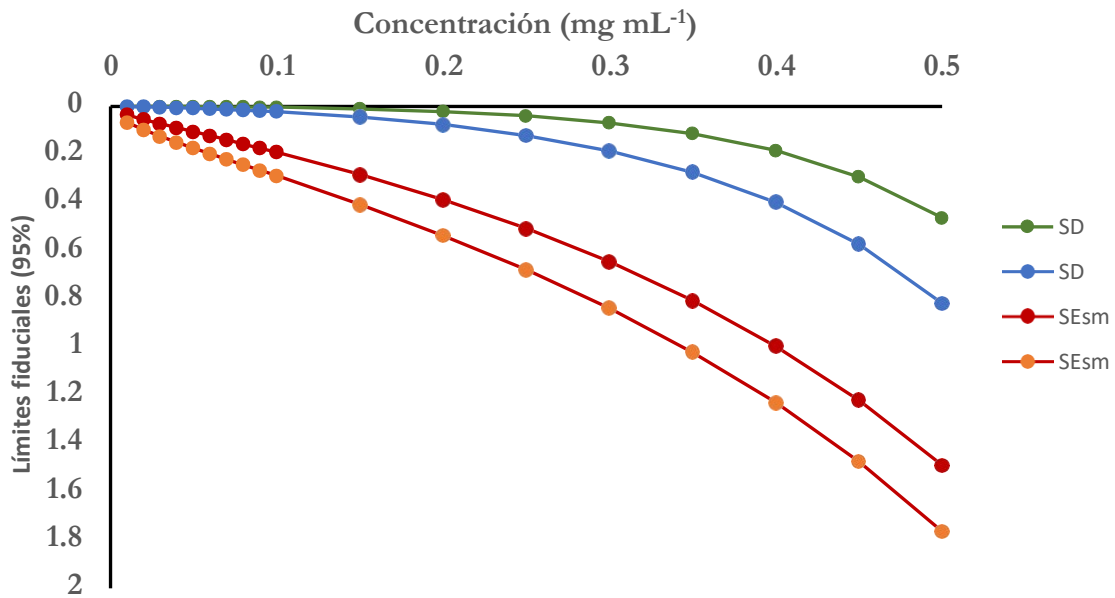
## 7.8 Estimación de la concentración efectiva ( $CE_{50}$ y $CE_{90}$ ) de SDT2-AE de *P. djamor* y SEsmT2-AE contra $L_3$ de *H. contortus*

En el Cuadro 20, se muestran las concentraciones ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) efectivas ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) para producir mortalidad de las  $L_3$  de *H. contortus*; para el SDT2-AE de *P. djamor*, la  $CE_{50}$  fue de  $0.636 \text{ mg mL}^{-1}$  y para el SEsmT2-AE  $1.627 \text{ mg mL}^{-1}$ ; observándose diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ) entre las dos  $CE_{50}$  y que se corroboró con el no traslape entre los límites fiduciales al 95% de las dos  $CE_{50}$  (Figura 33). El método PROBIT considera que dos valores de  $CE_{50}$  son estadísticamente iguales si existe traslape entre sus límites fiduciales al 95% (Robertson *et al.*, 2007 en Luck-Montero *et al.*, 2018). Para la  $CE_{90}$ , se obtuvo  $37.75 \text{ mg mL}^{-1}$  para el SDT2-AE de *P. djamor* y  $11.119 \text{ mg mL}^{-1}$  para el SEsmT2-AE, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dos  $CE_{90}$ , y sin traslape entre los límites fiduciales al 95% de las dos  $CE_{90}$  (Figura 34). La ponderación de la  $CE_{50}$  y  $CE_{90}$  que se obtuvo con el método PROBIT fue el siguiente: con una  $CE_{50}$ , el SDPdT2-AE fue significativamente más tóxico ( $p < 0.05$ ) que el SEsmT2-AE, ya que presentó una  $CE_{50}$  más baja. Sin embargo, con la  $CE_{90}$ , el SDPdT2-AE fue menos tóxico que el SEsmT2-AE; es decir, su AN fue menor, por presentar la  $CE_{90}$  más alta ( $p < 0.05$ ); por lo que, con esta concentración, el SEsmT2-AE resultó ser más tóxico o de mayor AN contra  $L_3$  de *H. contortus* que el SDT2-AE de *P. djamor*.

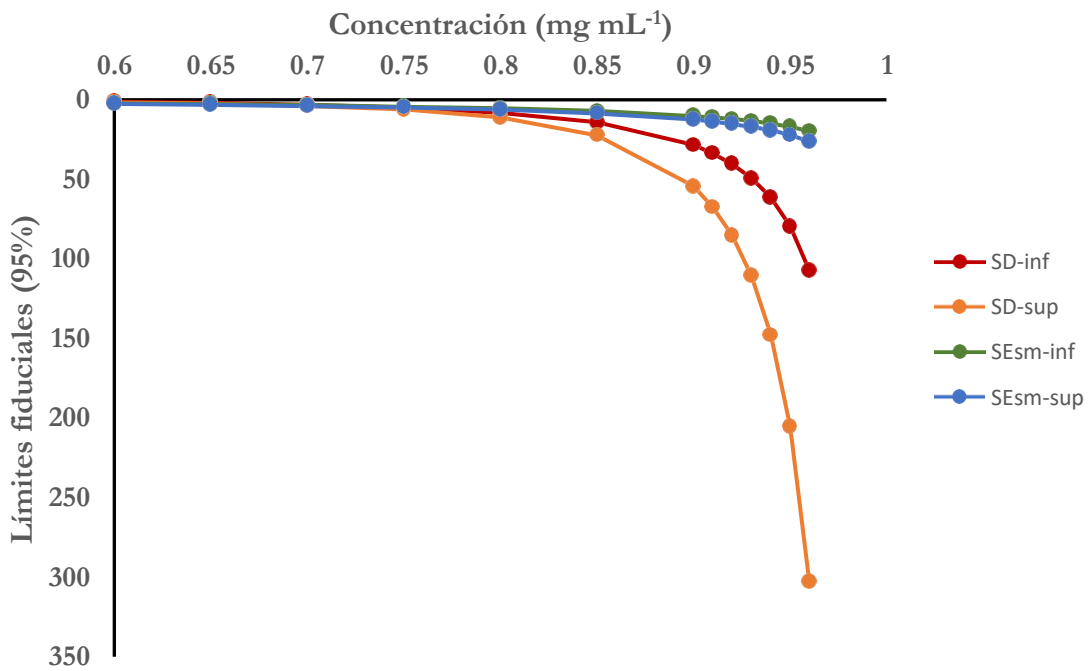
**Cuadro 20.** Estimación mediante el método PROBIT de la concentración efectiva ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) del SDT2-AE de *P. djamor* y SEsmT2-AE con actividad nematocida (72 h) sobre la  $ML_3$  de *H. contortus*.

Sustrato	$CE_{50}$	Límite inferior	Límite superior	$CE_{90}$	Límite inferior	Límite superior
<b>SDPdT2-AE</b>	0.63616b	0.46222	0.81744	37.74774a	28.38102	54.41595
<b>SEsmT2-AE</b>	1.62771a	1.48918	1.76431	11.11885b	10.09097	12.39819

SDPdT2-AE= Fracción de acetato de etilo del tratamiento T2 de sustrato degradado de *P. djamor*; SEsmT2-AE= Fracción de acetato de etilo del tratamiento T2 de sustrato estéril sin micelio. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la  $CE_{50}$  y la  $CE_{90}$  de los dos sustratos.



**Figura 33** Estimación de la concentración efectiva ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) del SDT2-AE de *P. djamor* sobre la  $ML_3$  de *H. contortus*.



**Figura 34.** Estimación de la concentración efectiva ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) del SEsmT2-AE sobre la  $ML_3$  de *H. contortus*.

## 8. DISCUSION

Los extractos hidroalcohólicos (EHA) de SD de *Pleurotus* spp. han demostrado AN contra la resistencia de *H. contortus* a compuestos AH de origen químico, por lo que se han reconocido como una estrategia de control sostenible contra NGI (Ambrosio-Bautista *et al.*, 2023; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022, 2020; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021; Montañez-Palma *et al.*, 2021; Cruz-Arévalo *et al.*, 2020; Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2017; Pineda Alegría, *et al.*, 2017). La actividad AH *in vitro* de EHA contra *H. contortus* se ha notificado mediante pruebas de inhibición de la eclosión de huevos, inhibición de la motilidad (mortalidad de larvas), e inhibición del desenvaine larval (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022; Aguilar-Marcelino *et al.* 2017; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021). La prueba de mortalidad (inhibición de la motilidad) de larvas L<sub>3</sub>, consiste en exponer la larva sin vaina a los respectivos extractos en un tiempo determinado y observar la motilidad inducida (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021); la posición de la larva y la carencia de movimiento, son indicativos de que la larva está muerta (Montañez-Palma *et al.*, 2021). EHA (metanol: agua, 70:30 v:v) de SD de *P. ostreatus* evaluados por Rodríguez-Barrera *et al.* (2021) utilizando *D. eriantha* Steud (16.16%), *Z. mays* (16.16%) y *C. canephora* (66.66%) (T2), reportaron 77% de ML<sub>3</sub> de *H. contortus* a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>, y 79% con 33.33% (T5) de cada insumo mencionado; el SEsm en este estudio no fue evaluado, el cual se ha reportado como un material sin ninguna actividad AH (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022); o no significativa (3.85%) (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). En el presente trabajo, los extractos etanólicos (EE) de SD de *P. djamor* con los mismos insumos y proporciones de T2 y T5, evaluados por Rodríguez-Barrera *et al.* (2021), mostraron %ML<sub>3</sub> (20 mg mL<sup>-1</sup>) de 75.05 (T2) y 55.75 (T5); las diferencias encontradas podrían estar relacionadas con el tipo de disolvente usado para la extracción de compuestos bioactivos (Vieira *et al.* en

Pineda- Alegría *et al.*, 2017); la mezcla de metanol: agua, extrae compuestos más polares así como una variedad de compuestos de menor polaridad (Ambrosio-Bautista *et al.*, 2023). Alvear-Díaz (2018) en Colmenares-Cruz *et al.* (2021) reportó una AN de 77.63% en extractos acetónicos de *P. ostreatus* contra *P. redivivus* más alta en comparación con el extracto metanólico (62.21%). Extractos de similar polaridad pueden producir diferentes efectos AH, aun cuando hayan sido obtenidos del mismo material vegetal (Valdez-Urióstegui *et al.*, 2021). Usando cinco (T6, T10, T11, T12, T13) mezclas de SD de *P. djamor* a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, Díaz-Rodríguez en el 2015 reportó AN contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* en un intervalo de 0 a 47% (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021); mientras que a esta misma concentración (20 mg mL<sup>-1</sup>) de SD de *P. ostreatus*, Páez-León (2018), reportó ML<sub>3</sub> mayor (92.03%). En el presente estudio, el SEsm de T2 y T5, bajo las mismas condiciones de trabajo que el SD de *P. djamor* (T2 y T5), el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* fue de 90.75% y 66.50%, respectivamente, la alta actividad AH particularmente del tratamiento T2, se atribuyó a la proporción usada en la mezcla de los insumos lignocelulósicos usados en el presente estudio, los cuales han sido evaluados contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* por otros autores (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021; Colmenares-Cruz *et al.*, 2021; Lara-Vergara, 2019). Extractos (metanol: agua, 70:30 v: v) de un total de 10 SD de *P. ostreatus* evaluados por Rodríguez-Barrera *et al.* (2021) utilizando *D. eriantha* Steud, *Z. mays* y *C. canephora* en diferentes porcentajes, demostró que los SD con mayor porcentaje de *C. canephora* presentaron mayor AN y los de menor porcentaje, menor AN. Por lo que en la obtención de metabolitos con AN, no solamente el tipo de extracción o la cepa son importantes a considerar, sino también los sustratos y/o mezclas de estos, donde se desarrollan los hongos son factores que influyen en la producción de compuestos bioactivos contra nematodos parásitos (Comans-Pérez *et al.*, 2021). En otros trabajos, la AN

encontrada en el SEsm se ha relacionado con la presencia de azúcares y polifenoles, que favorecen el metabolismo de los hongos, estos absorben parte de los compuestos en el cuerpo fructífero y otra parte de ellos son almacenados en el sustrato (Cabrera *et al.*, 2019; Carrasco-Cabrera *et al.*, 2019 en Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). Considerando el tiempo de colonización, Colmenares-Cruz *et al.* (2021), notificaron %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* en EHA de SD de *P. djamor* ECS-123, de 14.73% en la primera cosecha (SDP1) y 8.57%, en la segunda cosecha (SDP2). Al aplicar una bipartición líquida-líquida del extracto SDP1 (14.73%) se obtuvieron dos fracciones con AN, la fracción acuosa y la de acetato de etilo "PdAct", que a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, la "PdAct" fue la más efectiva (80.11%) comparado con un menor %ML<sub>3</sub> que presentó la fracción acuosa (15.99%) a aún a 40 mg mL<sup>-1</sup>. Porcentajes de ML<sub>3</sub> más altos a los obtenidos por Colmenares-Cruz *et al.* (2021) se obtuvieron en el presente estudio, en las fracciones de H (90.25) y AE (84.50) (20 mg mL<sup>-1</sup>) de T2 del SD (segunda cosecha) de *P. djamor* y del SEsm 83.50% (H) y 85% (AE), obtenidas por bipartición líquida-líquida. Las diferencias se atribuyeron por una parte a la relación de los insumos usados por Colmenares-Cruz *et al.* (2021) (1:1:1) Pasto pangola (*D. eriantha* Steud), olote de maíz (*Z. mays*) y pulpa de café (*C. canephora*), a diferencia de T2 (66.66% de *C. canephora*); se ha reportado que la cafeína inhibió el desarrollo larvario temprano de *Caenorhabditis elegans* y redujo el movimiento de *Galleria mellonella* (Da Silva, 2015). Extractos de acetona-agua de *Theobroma cacao* también han mostrado efecto ovicida y AN contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022). Por otra parte el SDP1 podría contener menor cantidad de compuestos bioactivos que el SDP2, ya que durante la colonización del sustrato lignocelulósico (el cual provee macro y micronutrientes necesarios para la producción de basidiomas (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022) y formación de primordios, muchos metabolitos de la cepa del hongo cultivado son liberados al

sustrato (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021; Colmenares-Cruz *et al.*, 2021), por lo que después de cosechar los basidiomas, el subproducto orgánico residual obtenido es a base de micelio, enzimas extracelulares, polisacáridos y biomasa lignocelulósica residual (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). Los %ML<sub>3</sub> obtenidos en el SEsm del presente trabajo, evidencian AN debido a compuestos bioactivos presentes en los insumos como la pulpa de café. Existen reportes que el EHA de pulpa de café presenta actividad AH debido a un grupo de compuestos de naturaleza fenólica (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021). Castañeda-Ramírez *et al.*, en el 2022, reportaron en EHA (metanol-agua, 70-30 % v/v), para las mismas proporciones de los insumos usados en el presente estudio, contenidos de compuestos fenólicos de 0.45 (T2) y 0.38 (T5). Los %ML<sub>3</sub> más bajos obtenidos en las fracciones de B y A del presente estudio, demostró menor eficacia en la extracción de metabolitos con estos disolventes. Se ha reportado que los extractos a base agua presentan menor AH en comparación con los extractos a base de disolventes orgánicos, debido a que el agua extrae menos compuestos bioactivos; por ejemplo, los extractos acetónicos presentan más compuestos bioactivos de amplio rango de polaridad y se ha demostrado que exhiben mayor actividad ovicida y larvicida sobre *H. contortus* que los extractos acuosos (Luck-Montero *et al.*, 2018). Un estudio demostró que el extracto acuoso, a diferencia de los EHA, todos obtenidos de *Agaricus blazei* se encontró que en la IEH de *H. contortus*, fue el más efectivo, atribuido a los compuestos bioactivos que mejor fueron liberados en el agua como disolvente de extracción (Vieira *et al.* en Pineda- Alegría *et al.* (2017). Arizmendi (2014) en Colmenares-Cruz *et al.* (2021) reportó AN en el extracto acuoso de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. En este estudio, en la segunda confrontación *in vitro* de las fracciones de H y AE, junto con los correspondientes, blancos, la fracción de AE, mostró los %ML<sub>3</sub> más altos (20 mg mL<sup>-1</sup>); así también a esta

concentración, la fracción de acetato de etilo (PdAct) del SD de *P. djamor* después de la primera cosecha (SPS1) de basidiomas causó un mayor %ML<sub>3</sub> (80.11%) en comparación con el extracto acuoso PdAcO (15.99%) y a una mayor concentración (40 mg mL<sup>-1</sup>) (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). En la inhibición del desenvaine en larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*, las fracciones obtenidas con acetato de etilo a partir de basidiomas (F3B) y micelio (F3M) de *P. djamor* fueron las que presentaron la mayor actividad AH (Pineda-Alegría, 2017). Curvas de concentración se han establecido para evaluar el %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*. EHA (metanol-agua, 70-30 v:v) de biomasa de micelio de hongo *N. ponderosus* de siete días de inoculación obtenido en cultivo sumergido con agitación en medio de papa dextrosa; (PD), Montañez-Palma *et al.* (2021), reportaron en concentraciones (mg mL<sup>-1</sup>) de 1.25, 2.5, 5.0 y 20, %ML<sub>3</sub> de 7.07, 10.79, 11.29 y 12.44, respectivamente; porcentajes de ML<sub>3</sub> más altos se obtuvieron en el presente trabajo en la fracción de AE de T2, tanto del SDPd como del SEsm: 59.08-46.83, 65.83-60.83, 74.08-75.41 y 89.41-96.91, respectivamente; las diferencias se atribuyeron al tipo de sustrato usado (PD e insumos lignocelulósicos), tiempo de inoculación (7 y 30 días), fuente de biomasa (micelio y SD), tipo de hongo (*N. ponderosus* y *P. djamor*) y purificación del extracto aplicado en el presente estudio (bipartición). Mismo tratamiento (SDPdT2) del presente trabajo, pero con el hongo *P. ostreatus* fue evaluado por Rodríguez Barrera *et al.* (2022) en seis concentraciones de EHA metanol agua (70:30 v:v), de las cuales a 1.25, 2.5, 5 y 10 mg mL<sup>-1</sup>, los %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, fueron de 24.76, 29.85, 65.63 y 77.35, respectivamente; porcentajes más altos de ML<sub>3</sub> se obtuvieron en el presente trabajo, particularmente en las concentraciones más bajas de 1.25 y 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, tanto del SDPd como del SEsm: 59.08-46.83 y 65.83-60.83, respectivamente, lo cual podría ser atribuido al tipo de hongo y su eficacia antihelmíntica (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017). Usando seis

concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg mL<sup>-1</sup>) e Ivermectina y *Thiabendazole* (5 mg mL<sup>-1</sup>) como controles, Colmenares-Cruz *et al.* (2021) reportaron mortalidad de larvas de *H. contortus* a partir de EHA (70:30 agua: metanol) por 24 h, para el SEsm y SD de la segunda cosecha de basidiomas (SPS2) de *P. djamor*, los cuales fueron elaborados con una mezcla (1:1:1) de pasto pangola (*D. eriantha*), pulpa de café (*C. canephora*) y olote de maíz (*Z. mays*), obteniendo %ML<sub>3</sub> de 1.35, 1.75, 2.90, 3.0, 4.45 y 3.85 (SEsm) y 1.6, 3.75, 4.97, 8.79, 8.42, y 8.57 (SPS2), respectivamente; la mortalidad de larvas fue significativamente menor a la obtenida en el presente trabajo, en las concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 7.5 y 20 mg mL<sup>-1</sup> tanto en el SEsm (46.83, 60.83, 75.41 y 96.91%) como del SDPd: 59.08, 65.83 74.08 y 96.91%), respectivamente. Las diferencias con dicho trabajo son atribuidas a diferentes factores como la proporción de insumos (*p.e* menor porcentaje de pulpa de café), el sistema de extracción (mayor fase acuosa), tiempo de maceración (24 h) en lugar de 72 h y dos maceraciones; además de un proceso de purificación del extracto por bipartición (reportando los %ML<sub>3</sub> con la fracción de AE). Por lo que, para poder identificar primeramente los compuestos asociados con la AN en cada uno de los extractos, son necesarios el fraccionamiento biodirigido con estudios micoquímicos (Ambrosio-Bautista *et al.*, 2023). En el presente trabajo, de las 22 fracciones colectadas del SDPdT2-AEC se juntaron por CPF cinco reuniones (“R2”, “R3”, “R4”, “R5” y “R6”) y del SEsmT2-AEC, cuatro (“R2”, “R3”, “R5” y “R8”), obteniendo a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup>, %ML<sub>3</sub> por arriba del 80%, excepto en “R8” (79.60%); sobresaliendo “R4” (95.20%) y “R6” (97.0%) del SDPdT2-AEC y “R3” (96.40%), y “R5” (96.40%) del SEsmT2-AEC. Porcentajes más bajos de ML<sub>3</sub> se reportaron a una concentración más alta (10 mg mL<sup>-1</sup>) 72 h de postconfrontación (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021), a partir de la fracción PdAct (80.11% de ML<sub>3</sub>) de la SPS1 de *P. djamor*, de la cual se colectaron 13 fracciones en

columna y se agruparon por CPF en cinco mezclas (“R1”:1-3, “R2”: 4-7, “R3”: 8-9, “R4”: 10-11 y “R5”: 12-13), la mortalidad de larvas más alta fue en la mezcla “R4” (14.80%) y en la “R5” se observó un efecto nemostático de 70.24%, es decir, disminución de la movilidad. Las diferencias se atribuyeron a la relación de los insumos usados y a la etapa de colonización del SD, como previamente fue señalado. La evaluación biodirigida contribuye a encontrar e identificar los compuestos responsables de la actividad AH respectiva, y se realiza con las fracciones obtenidas de los extractos sometidos al fraccionamiento en columna (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2022). En un estudio con EHA, la mayoría de los compuestos no migraron con la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:5); sin embargo, al asperjar (*spraying*) las placas con Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> se mostró que los perfiles de las manchas se alinearon con la migración del perfil del ácido oleanólico; la placa obtenida por CPF de la mezcla “R4”, del presente estudio, mostró una migración y separación de los compuestos en el sistema de elución usado; sin embargo los perfiles de las mezclas, “R3” y “R5” del SEsmT2-AEC, la mayoría de los compuestos no emigraron en la fase móvil: agua-acetonitrilo (50:50), esto podría deberse a la presencia de compuestos glucosídicos (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020) presentes en los sustratos sin micelio, por lo que la conjugación de azúcares en estos sustratos podría explicar la dificultad de migración de los compuestos sobre las placas de sílice así como la separación cromatográfica (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020) como fue observada en las reuniones del SD de *P. djamor*. Sin embargo, las reuniones (5 mg mL<sup>-1</sup>) seleccionadas en ambos sustratos, presentaron %ML<sub>3</sub> de *H. contortus*, cerca del 80%, entre 82 y 87%, y > 95%. Para una calificación de actividad AH, los estándares de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAP, *World, Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*) ha establecido que un 90% de eficacia es considerada muy buena, mientras que un 80-90% es

moderadamente efectiva (Wood *et al.*, 1995 en Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Con base a los estándares de la WAAP, en el presente trabajo, las reuniones “R4” y “R6” (SD de *P. djamor*), y “R3” y “R5” (SEsm), incluyendo las MR de ambos sustratos, fueron consideradas de muy buena eficacia para inhibir la motilidad de las L<sub>3</sub> de *H. contortus*. Las L<sub>3</sub> sin movimiento (inmóviles) cuantificadas en este estudio como %L<sub>3</sub> muertas de *H. contortus*, se han reportado con este comportamiento en estudios realizados con AH químicos contra NGI (Martín, 1979 en Moreno-García, 2013), y se ha explicado en función del mecanismo de acción de los fármacos, por ejemplo, las LM inhiben la transmisión neuronal y la contracción muscular, provocando parálisis en los músculos somáticos y faríngeos (Joyner, 2010, Portillo *et al.*, 2003); el Abendazol, al inhibir la síntesis de los microtúbulos y alterar irreversiblemente la captación de la glucosa, da como resultado que el parásito se inmovilice y muera con lentitud por falta de energía (Katzung, 2007 en Moreno-García, 2013). Colmenares-Cruz *et al.* (2021) reportaron %ML<sub>3</sub> de *H. contortus* para las mezclas “R4” y “R5” (5 mg mL<sup>-1</sup>) de 35.61 y 46.76, respectivamente, dichas mezclas se obtuvieron de EHA de SD de *P. djamor* (SPS1); la mortalidad de larvas fue menor a las obtenidas en el presente trabajo, y podría atribuirse al estado de colonización del SD, por lo que el SDP2, demuestra mayor eficacia con base a los estándares de la WAAP (Wood *et al.*, 1995 en Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). La caracterización de “R4” y “R5” por CG-EM realizada por Colmenares-Cruz *et al.* (2021) reveló para “R4”, compuestos aromáticos como alcohol veraltrílico (47.83%), cafeína (13.73%) y 4-hidroxi-3,5,5-trimetil-4-[3-oxo-1-butenil]-2-ciclohexen-1-ona (7.25%), otros como 5,6-dimetoxi-1(3H)-isobenzofuranona (3.45%), ácido benzoico (2.77%), coumaran (2.04%), ácido  $\alpha$ -toluico (0.94%), y n-dibutil phthalato (0.74%), entre otros, en total 21 componentes; mientras que “R5” presentó cafeína (84%, TR de 19.9 min) y un compuesto no identificado (15.83%, TR de 39.90 min); los autores

reportaron un efecto sinérgico entre las moléculas, al observar una mayor  $ML_3$  (80%) en la fracción de acetato de etilo (PdAct) y que disminuyó a <66% al ser sometida a un fraccionamiento bio-dirigido. En el presente trabajo, se identificaron por CG-EM metabolitos que fueron comunes entre las reuniones como ácidos grasos (ácido n-hexadecanoico, hexadecanamida, y octadecanamida), phthalatos, y cafeína; y otros que fueron propios de cada reunión, como alcohol 3,4-dimetoxibencílico, 5,6 dimetoxi benzofuranona-1(3H), 5-Hidroxi-1,3-dimetillidolinona-2 (“R4”); 2,2,4 trimetil-1,3 pentanediol diisobutirato (“R6”) del SDT2-AEER de *P. djamor*, y del SEsmT2-AEER, 2,3-dihydrobenzofurano, 2-metoxi-4-vinilfenol y nandrolona (“R3”), y tereftalato de bis(2-etilhexilo (“R5”). Los ácidos grasos (ácido pentadecanoico, ácido palmítico, sitosterol y ácido linoleico) son compuestos que se han reportado y se les ha atribuido AN, así como a alcaloides, quinonas, péptidos, terpenoides, polifenoles, taninos, ácidos grasos y  $\beta$ -sitosterol, entre otros (Li y Zhang, 2014, Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021; González-Cortazar *et al.*, 2021; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020; Pineda-Alegría *et al.*, 2017; 2020; Colmenares-Cruz *et al.*, 2021; Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Estudios previos han notificado la importancia de mezclas de metabolitos secundarios en las fracciones activas y su importancia en la actividad AH, y se ha propuesto que no solo a una molécula en particular se atribuye la actividad contra los nematodos sino a una mezcla de ellas (Ambrosio-Bautista *et al.*, 2023). Por ejemplo, el ácido cafeico no es una molécula activa por sí misma, sino que actúa como compuesto sinérgico contra huevos de *Cooperia* spp. y *H. contortus* (Vargas-Magaña *et al.*, 2014 en Colmenares-Cruz *et al.*, 2021); también se ha reportado efecto contra las bacterias: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Da Silva, 2015). En el presente trabajo, la actividad AH más alta del tratamiento T2 podría atribuirse a un mayor porcentaje de *C. canephora* (66.66) que en T5 (33.33), y un menor porcentaje de los otros insumos, como el pasto pangola (*D. eriatha*) el cual

normalmente es considerado un material sin ninguna actividad AH, y que se ha usado en el control de dietas de estudios involucrando animales infectados con NGI (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022); a diferencia de los residuos de café (*C. arabica*) que han demostrado actividad AH *in vitro* en un reporte del 2016 (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022). También se ha demostrado que la cafeína causa choques térmicos, promueve la proteostasis, induce una alta expresión de genes de la familia cyp-35A e inhibe el desarrollo larvario temprano de *Caenorhabditis elegans* y reduce el movimiento de *Galleria mellonella* (Min *et al.*, 2015; Maguire *et al.*, 2017; Brunquell *et al.*, 2018 en Colmenares-Cruz *et al.*, 2021). La diversidad de metabolitos con actividad AH (~200 compuestos tóxicos con AN) encontrados en los hongos (Salmones *et al.*, 2020), hace manifiesto que no solamente el tipo de extracción o la cepa son importantes a considerar para la obtención de metabolitos nematocidas, sino también los sustratos y/o mezclas de los mismos donde se desarrollan los hongos, son factores que influyen en la producción de compuestos bioactivos contra nematodos (Comans-Pérez *et al.*, 2021); además de las fases de crecimiento de *P. ostreatus*, en las cuales se han reportado variaciones en las moléculas bioactivas, encontrando un mayor contenido de azúcares reductores, fenoles y flavonoides en extractos acuosos de basidiomas maduros, y un mayor contenido de carbohidratos y fenoles en primordios (Beltran *et al.*, 2019 en Colmenares-Cruz *et al.*, 2021).

En extractos acuosos de plantas con actividad AH contra *H. contortus* también se han reportado bionematicidas, como en *Pluchea sericea* y *Artemisia tridentata*, para las cuales se reportó una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 23.21 y 23.26 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente, para la IEH, y de 20.36 y 27.18 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para mortalidad larvaria (Luck-Montero *et al.*, 2018); entre tales valores de CL<sub>50</sub> no se observaron diferencias significativas (p>0.05), ya que hubo traslape entre los límites fiduciales al 95%. Montañez-Palma *et al.* (2021), reportaron CL<sub>50</sub> de

EHA de micelio del hongo *Neolentinus ponderosus* contra larvas (L<sub>3</sub>) de *H. contortus* de 0.55.

En el presente trabajo, la CE<sub>50</sub> del SDT2-AE de *P. djamor* fue de 0.63 mg mL<sup>-1</sup>, mayor a la reportada con micelio de *N. ponderosus* siendo por lo tanto más efectiva que el EHA de SD de *P. djamor* y aún más tóxico que el SEsmT2-AE con una CE<sub>50</sub> de 1.62771 mg mL<sup>-1</sup>. EHA metanol: agua (70:30 v:v) obtenidos a partir de SEsm (T1, T4 y T8) usados comúnmente en la producción comercial de *Pleurotus* spp. (olote de maíz (*Z. mays* (Zm)), pulpa de café (*C. canephora* (Co)), y pasto pangola (*D. eriantha* Steud (Di)), mostraron concentraciones efectivas 50% (CE<sub>50</sub>) de 1.1897, 1.5764 y 1.1934 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* (Castañeda-Ramírez *et al.* (2022), las cuales fueron menores a la CE<sub>50</sub> del SEsmT2-AE del presente trabajo. Las diferencias se atribuyeron a la proporción de los insumos usados, T1 (100%, Co), T4 (100%, Zm) y T8 (16.16% de cada insumo), mientras que en el presente trabajo: T2 (16.16% Zm, 16.16% Di y 66.66% Co). Estudios han demostrado la importancia de la mezcla de metabolitos secundarios en las fracciones activas, indicando que la AN no se atribuye a una simple molécula de los hongos, sino que esta actividad puede ser favorecida por la sinergia entre moléculas (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2022; Ambrosio-Bautista *et al.*, 2023; Colmenares-Cruz *et al.*, 2021; Pineda Alegría *et al.*, 2020; Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). Lo anterior se ha demostrado con moléculas puras (ácido pentadecanoico, ácido palmítico, β-sitosterol, ácido esteárico y ácido linoleico) y sus combinaciones contra *H. contortus* (Pineda Alegría *et al.*, 2020). En la fracción activa “F5” se encontró β-sitosterol (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020), el cual puede estar conjugado con azúcares (β-sitosterol glucósido), su CE<sub>50</sub> fue de 0.0825 mg mL<sup>-1</sup> en la confrontación contra el nematodo *C. elegans* (Deepak *et al.*, 2002 en Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). La AN del SEsm se ha relacionado con la presencia de azúcares y polifenoles (Carrasco-Cabrera *et al.*, 2019 en Colmenares-

Cruz *et al.*, 2021). Se sabe que los glucósidos tienen propiedades nematocidas (Hrckova y Velebny, 2013 en Cruz-Arévalo *et al.*, 2020); también se ha documentado que alcoholes, derivados de ácidos grasos, aldehídos, terpenos y compuestos fenólicos, actúan sinérgicamente en la AN (Park *et al.* (2007) en Cruz-Arévalo *et al.*, 2020). A partir de EHA de basidiomas de *P. djamor* y *L. edodes*, Ambrosio-Bautista *et al.* (2023) reportaron  $CE_{90}$  de 0.948 y 0.856 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente; a partir de EHA de micelio del hongo *Neolentinus ponderosus* contra L<sub>3</sub> de *H. contortus*, la  $CL_{90}$  estimada por Montañez-Palma *et al.* (2021), fue de 2 mg mL<sup>-1</sup>; mientras que en el presente estudio, la  $CE_{90}$  del SDT2-AE de *P. djamor* y SEsmT2-AE, fue de 37.74 y 11.11 mg mL<sup>-1</sup>. La AN de menor CE observada con los EE evaluados en el presente trabajo, demuestra que la efectividad de los bio-nematicidas dependerá no solo del tipo de hongo, sino de la parte usada, así como del proceso de elaboración de los sustratos. La  $CE_{50}$  y  $CE_{90}$  reportadas en el presente trabajo, demostró que a una  $CE_{50}$ , el SDT2-AE de *P. djamor* es más tóxico o más efectivo que el SEsm; sin embargo, a una  $CE_{90}$ , el sustrato sin micelio resultó ser más tóxico que el SDPdT2-AE para inmovilizar larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*; por lo que el SDT2-AE de *P. djamor* al igual que el SEsmT2-AE evaluados en este trabajo, podrían considerarse como alternativa sustentable para el control de NGI en pequeños rumiantes con potencial nematocida que podrían producir cuadros de toxicidad con daño físico aparente en las larvas como los reportados en otros trabajos: actividades de parálisis e inactivación de L<sub>3</sub> (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021); degradación de la cutícula (Soares *et al.*, 2019 en Colmenares-Cruz *et al.*, 2021); alteraciones de la membrana, homeostasis y alteraciones ultraestructurales en la ruta transcuticular (Colmenares-Cruz *et al.*, 2021); úlceras internas y contracciones con las L<sub>3</sub> del control negativo las cuales parecieron muy activas y sin daño físico aparente (Cruz-Arévalo *et al.*, 2020; Cruz-Arévalo, 2017).

## 9. CONCLUSIONES

La actividad nematocida *in vitro* de los extractos etanólicos varió en función de la polaridad de los disolventes; las mortalidades más altas de L<sub>3</sub> de *H. contortus* se obtuvieron con las fracciones de hexano y acetato de etilo, tanto en T2 como en T5. La proporción de los insumos lignocelulósicos, influyó en la mortalidad de larvas, T2 con 66% de pulpa de café (*Coffea canephora*) mostró mortalidades más altas que T5 con solo el 33%. La fracción de acetato de etilo de los dos sustratos (SDPd y SEsm) presentaron incremento de mortalidad de larvas infectantes L<sub>3</sub> de *H. contortus* conforme aumentó la concentración de cada sustrato; sin embargo, el SEsm mostró porcentajes más altos (>90%). Las reuniones de T2-AE del SD de *P. djamor* y del SEsm, mostraron efecto nematocida significativo (>90%). Se identificaron compuestos nematocidas de naturaleza fenólica en el SD de *P. djamor* así como en el SEsm, lo que evidenció un efecto asociado de metabolitos entre *P. djamor* y los insumos lignocelulósicos. La actividad nematocida *in vitro* encontrada se atribuyó no solo a un metabolito en particular, sino a una mezcla de ellos, reportada también por otros autores. A una CE<sub>50</sub>, el SDT2-AE de *P. djamor*, demostró mayor efecto nematocida que el SEsm; sin embargo, a una CE<sub>90</sub>, el SEsm fue más tóxico que el SDPdT2-AE, quizás atribuido principalmente a la pulpa de café. Los resultados obtenidos indican que para el control de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus*, resulta importante considerar la fuente de insumos lignocelulósicos para elaborar el SD de *P. djamor*; además, el SEsm a base de pulpa de café podría representar otra alternativa sustentable y sostenible para el control de NGI en ovinos.

## 10. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- ❖ Evaluar el efecto nematicida de la cafeína comercial sobre larvas infectantes L<sub>3</sub> de *H. contortus*.
- ❖ Realizar experimentos en ovinos mediante pruebas de dosificación con las fracciones que presentaron mayor efectividad con fuentes de alimentación tradicional.
- ❖ Realizar pruebas con jerbos (*Meriones unguiculatus*) para evaluar actividad nematicida contra *H. contortus*.
- ❖ Evaluar la actividad nematicida sobre otras etapas parasíticas de *H. contortus* como huevos para la IEH, larvas juveniles (J2).

## 11. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Marcelino, L., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Sánchez, J.E., González-Cortazar, M., Mancilla-Montelongo, M.G., González-Pech, P.G., Pineda-Alegría, J.A., Ventura-Cordero, J. & Castañeda-Ramírez, G.S. (2024). Research on chemical compounds from edible mushrooms for the control of gastrointestinal nematodes and phytoparasites. *Review. Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27:011.
- Aguilar-Marcelino, L. (2018). Hongos comestibles una alternativa de control contra parásitos de ovinos. *Hypatia. Fordecyt. CONACYT*, 3-4.
- Aguilar-Marcelino, L., Sánchez-Vázquez, J.E. & Mendoza-de-Gives, P. (2017). Uso biotecnológico de productos obtenidos a partir de *Pleurotus* spp. en el control de nematodos parásitos de importancia pecuaria. En: La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. José E. Sánchez y Daniel J. Royse, Eds. Chiapas, México; ECOSUR. Pp.: 297-309.
- Aldaz-Merchán, L. (2018). Evaluación de la actividad nematicida de los extractos acetónico y metanólico de *Pleurotus ostreatus*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador. Tesis.
- Alunda, J.Ma., Cuquerella, M. & Fawzy, E.M. (2013). Primera vacuna recombinante frente a la hemoncosis ovina. Universidad Complutense de Madrid, Oficina de transferencia de resultados de investigación. <http://www.ucm.es/info/icpvet>
- Alvarez-Zapata, R., Sánchez-Medina, A., Chan-Bacab, M., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., García-Rodríguez, R.V. & Peña-Rodríguez, L.M. (2015). Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants. *Journal of Chromatography*, 1422: 213-221.

doi:10.1016/j.chroma.2015.10.026

- Alvear-Díaz, L.V. (2018). Evaluación de la actividad nematocida del hongo *Pleurotus Ostreatus in vitro* en diferentes concentraciones sobre dos especies de nematodos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Tesis.
- Ambrosio-Bautista, J., Rodríguez-Labastida, M., Sánchez-Vázquez, J.E., Torres-Acosta, J.F.J., Castañeda-Ramírez, G.S. & Aguilar-Marcelino, L. (2023). Evaluación *in vitro* de extractos de hongos comestibles en la prueba de eliminación de la vaina larval contra *Haemonchus contortus*. [In vitro assessment of edible mushroom extracts in the larval exsheathment test against *Haemonchus contortus*]. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26:004.
- Angulo-Cubillán, F.J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., De-la-Fuente, C. & Alunda, J.M. (2007). *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 17(6): 577-587.
- André-Genier, H., Freitas-Soares, E.F., Queiroz, J.H., Gouveia, A.D.S., Araújo J.V., Braga, F.R., Rebouças-Pinheiro, I. & Kasuya, M.C.M. (2015). Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *Afri. J. Biotechnol.*, 14:1496-1503.
- Anziani, O.S. & Fiel, C.A. (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la argentina RIA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Buenos Aires, Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 41 (1):34-46.
- Aparicio-Medina, J.M., Paredes-Vanegas, V., González-López, O. & Navarro-Reyes, O. (2011). Impacto de la ivermectina sobre el ambiente. *Revista Científica*, 11(17): 64-66. ISSN 1998-8850 [www.una.edu.ni/diep/calera](http://www.una.edu.ni/diep/calera).
- Areskog, M., Sollenberg, S., Engström, A., Samson, H.G. & Von, H.J. (2014). A controlled study on gastrointestinal nematodes from two cattle farms

- showing field evidence of ivermectin resistance. *Parasitology and Vectors*, 7(13).
- Arteaga, M.B., Soria, C.A. & Ordoñez, M.E. (2020). Determinación del potencial nematocida y nematostático *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) sobre larvas J2 de *Globodera pallida* (Stone). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 41(1): 45-50.
- Balic, A., Bowles, V.M. & Meeusen, E.N.T. (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology*, 24 (1):39-46.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D. & Van Wyk, J.A. (2016a). The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93: 95-143.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D. & Van Wyk, J.A. (2016b). Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. En R. Gasser, y G.V. SamsonHimmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus* and Haemonchosis past, present and future trends, vol. 93. Pp.: 181-238. Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Byron, A., Hernández, F., Castro, E.G. & Cubides, J.A. (2018). 20 años de investigación en nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Conexión Agropecuaria*, 8:352-355.
- Cano-Estrada, A. & Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles. *Revista Chilena de Nutrición*, 43 (1).
- Cardona, A.J., Álvarez, P.J. & Pérez, O.J. (2017). Muerte súbita por alotrofia y hemoncosis en una cabra (*Capra aegagrus hircus*) del Departamento de Córdoba, Colombia. *Ciencia Animal*, 9(2):222-226.
- Castañeda-Ramírez, G.S., Lara-Vergara, I.Y., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Sánchez, J.E., Ventura-Cordero, J., García-Rubio, V.G. & Aguilar-Marcelino, L. (2022). *In vitro* anthelmintic activity of extracts from

- coffee pulp waste, maize comb waste and *Digitaria eriatha* S. alone or mixed, against *Haemonchus contortus*. *Waste and Biomass Valorization*, 13(8): 3523-3533.
- Castañeda-Ramírez, G.S., Torres-Acosta, J., Sánchez-Vázquez, J.E., Mendoza-de-Gives, P., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Al-Ani, L., Sandoval-Castro, C., de Freitas Soares, F.E. & Aguilar-Marcelino, L. (2020). The possible biotechnological use of edible mushroom bioproducts for controlling plant and animal parasitic nematodes. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2020/6078917>, 6078917.
- Cepeda-Martínez, E.R. (2017). Estudio parasitológico de nematodos gastrointestinales en ovinos del Municipio de Ubaté, Cundinamarca. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tesis.
- Chan-Perez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Castañeda-Ramírez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C. & Hoste, H. (2017). Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L<sub>3</sub> larvae. *Veterinary Parasitology*, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.023>.
- Colmenares-Cruz, E., González-Cortazar, M., Castañeda-Ramírez, G.S., Andrade-Gallegos, R.H., Sánchez, J.E. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Nematocidal activity of hydroalcoholic extracts of spent substrate of *Pleurotus djamor* on L<sub>3</sub> larvae of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 300:109608.
- Comans-Pérez, R.J., Sánchez, J.E., Al-Ani, L.K.T., González-Cortazar, M., Castañeda-Ramírez, G.S., Mendoza de Gives, P., Sánchez-García, A.D., Millán-Orozco, J. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biological Control*, 152, 104420.

- Contreras-Moreno, N. & García-Sandoval, R. (2022). *Pleurotus* spp., producción, cultivo y propiedades. En: Potencialidades de la ovicultura y los hongos comestibles (*Pleurotus* spp.) en la seguridad alimentaria y el desarrollo rural. Editorial: Laberinto Ediciones. Pp.: 81-106. <https://www.researchgate.net/publication/361472726>.
- Cruz-Arévalo, J., Sánchez, J.E, González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Andrade-Gallegos, R.H, Mendoza-de Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L. (2020). Chemical composition of an anthelmintic fraction of *Pleurotus eryngii* against eggs and infective larvae (L<sub>3</sub>) of *Haemonchus contortus*. *Biomed Research International*, 4138950: 1-8.
- Cruz-Arévalo, J. (2017). Estudio químico dirigido de cuerpos fructíferos del hongo comestible: *Pleurotus eryngii* con actividad nematocida. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Tesis.
- Cuevas-Padilla, E.J., Aguilar-Marcelino, L., Sánchez, J.E., González-Cortazar, M., Zamilpa-Álvarez, A., Huicochea-Medina, M., López-Arellano, M.E., Mendoza-de-Gives, P., Hernández-Velázquez, V.M. & González-Garduño, R. (2018). A *Pleurotus* spp. hydroalcoholic fraction possesses a potent *in vitro* ovicidal activity against the sheep parasitic nematode *Haemonchus contortus*. En: Updates on Tropical Mushrooms. Basic and Applied, Research. Editado por Sánchez J.E, Mata G., Royse D.J. Pp.: 193-211, ECOSUR, Chiapas, México. ISBN: 978-607-8429-60-8.
- Da, Silva & Lima, J.C. (2015). Actividad antibacteriana de extractos de *Morinda citrifolia* L. Na inibicao de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Plantas Red.* ISSN 1516-0572.
- Diamantopoulou P, Philippoussis A. (2015). Cultivated mushrooms: preservation and processing. 495–526. doi:10.1201/b19252-26.

- Díaz-Rodríguez, E. (2015) Evaluación *in vitro* de extractos hidroalcohólicos del sustrato agotado del hongo *Pleurotus djamor* en contra de huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. En: Ingeniería en Biotecnología. Pp.: 1-104, Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Tesis.
- Díaz-Rodríguez, E.E. (2015). Evaluación *in vitro* de extractos hidroalcohólicos del sustrato agotado del hongo *Pleurotus djamor* en contra de huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos, México. Tesis.
- Dibarrat, A.J. & Montes de Oca, J.R. (2012). Epidemiología de los ovinos en México. Centro de Investigación y estudios avanzados en Salud Animal. FMVZ. UAEM, 21: 05-09.
- Dzhafarov, M.K.H., Vasilevich, F., Dovgalev, A. S., Imamkuliev, K.D. & Pautova, E.A. (2016). Anthelmintic substances: main classes, problems, trends in development and prospects. *Medicine Parasitology*, 2: 47-53.
- Emery, D.L., Hunt, P.W. & Le Jambre, L.F. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?. *International Journal for Parasitology*, 46(12):755-769.
- 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 infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2): 246-54.
- FAO. (2020). OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2028. OECDi-Library. Doi: 10.1787/7b2e8ba3-es.
- Ghisalberti, E.L. (2008). Detection and isolation of bioactive natural products. In: *Bioactive Natural Products*, S.M. Colegate and R.J. Molyneux, eds. (Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group). Pp.: 12-76.

- Gómez-Rodríguez, O., Pineda-Alegría, J.A., Castañeda-Ramírez, G.S., González-Cortazar, M., Sánchez, J.E. & Aguilar-Marcelino L. (2022). Actividad nematocida *in vitro* de la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* contra J2 *Meloidogyne enterolobii*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(2).  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2202-2>
- González-Garduño, R., Cordova, P.C., Torres, H.G., Mendoza de Gives, P. & Arece, G.J. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 42(2): 125-135.
- González-Cortazar, M., Sánchez, J.E., Huicochea-Medina, M., Hernández-Velázquez, V.M., Mendoza-de-Gives, P., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Pineda-Alegría, J.A. & Aguilar-Marcelino, L. (2020). *In vitro* and *in vivo* nematocidal effect of *Pleurotus djamor* fruiting bodies against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 24(3): 310-318.
- González-Cortazar, M., Sánchez, J.E., Huicochea-Medina, M., Hernández-Velázquez, V.M., Mendoza-de-Gives, P., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Pineda-Alegría, J.A. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). *In vitro* and *in vivo* nematocidal effect of extract fractions of *Pleurotus djamor* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 24: 310-318.
- González, R. J.L. (2007). Caracterización fenotípica de corderos Pelibuey resistentes y susceptibles a *Haemonchus contortus* bajo condiciones naturales. Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, México. Tesis.
- Gregorio-Illescas, L. (2019). Mecanismo de acción de antiparasitarios (II). *Antihelmínticos*. Universidad Complutense. Tesis
- Guadarrama-Mendoza, P.C. (2013). Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de *Pleurotus*

- spp. de la región Mixteca. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. Tesis.
- Harder, A. (2016). The biochemistry of *Haemonchus contortus* and other parasitic nematodes. En: R. Gasser y G.V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus* and Haemonchosis past, present and future trends, vol. 93. Pp: 01-26. Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Hernández-Bolio, G.I., Kutzner, E., Eisenreich, W., Torres-Acosta, F de J. & Peña-Rodríguez, L.M. (2017). The use of <sup>1</sup>H-NMR metabolomics to optimise the extraction and preliminary identification of anthelmintic products from the leaves of *Lysiloma latisiliquum*. *Phytochemical Analysis*, 29(4), 413-320. doi:10.1002/pca.2724.
- Hernández, B.A. (2011). Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovinos canarias. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Tesis.
- Hernández, V.J.N. (2015). Interacción parásito-hospedador entre nematodos gastrointestinales y razas ovinas canarias papel de los linfocitos T  $\gamma$   $\delta$  y los eosinófilos. Instituto Universitario de Salud Animal y Seguridad Alimentaria. Las Palmas de Gran Canaria. Tesis.
- Heydari, R., Vierta, E. & Goltapech, E.M. (2006). Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. *Plant Pathology Journal*, 5:173-177.
- Joyner, M. (2010). Investigación de los efectos de nuevos antihelmínticos. amidantel, bay d9216 y tribendimidina. Tesis.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M. & Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus*

- exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3): 127-134.
- Kotze, A.C. & Prichard, R.K. (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanism and diagnosis. En: R. Gasser y G.V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus* and Haemonchosis past, present and future trends, vol. 93. Pp.: 397-428. Oxford, United Kingdom: Academic press- Elsevier.
- Kumarasingha, R., Preston, S., Yeo, T.Ch., Lim, D.S.L., Tu, Ch.l., Palombo, E.A., Shaw, J.M., Gasser, R.B. & Boag, P.R. (2016). Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasites Vectors*, 9: 187. doi:10.1186/s13071-016-1458-9.
- Kwok, O.C.H., Plattner, R., Weisleder, D. & Wicklow, D.T. (1992). A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2): 127-136, 1992.
- Lara-Vergara, I.Y. (2019). Evaluación *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de insumos para el cultivo del hongo *Pleurotus* spp., contra *Haemonchus contortus*. Universidad Autónoma de México. Estado de México. Tesis.
- Leyva-Mendivil, A.L. (2013). Evaluación de la obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en heces con diferentes días de refrigeración. Instituto Tecnológico de Sonora. Tesis.
- Li, H.G. & Zhang, K. (2014). Nematodetoxic and their nematocidal metabolites. In: Zhang K, Hyde KD (eds.) Nematode-trapping fungi: Fungal diversity research. *Mushroom Foundation*, Yunnan. Pp. 313-375. Doi: 10.1007/978-94-017-8730-7.
- Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E, Mendoza de Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L. (2011). Manual de diagnóstico para la identificación de larvas

- de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Publicación Especial, No. 2. Pp.: 1-48. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, Cuernavaca.
- Liébano, H.E., Vázquez, P.V. & Fernández, R.M. (1998). Sobrevivencia de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en un clima subcálido subhúmedo en México. *Veterinaria México*, 29(3), 245-249.
- López-Rodríguez, G., Rivero-Pérez, N., Olmedo-Juárez, A., Valladares-Carranza, B., Rosenfeld-Miranda, C., Hori-Oshima, S. & Zaragoza-Bastida, A. (2022). Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Leucaena leucocephala* sobre la eclosión de *H. contortus in vitro*. *Abanico Veterinario*, 12:1-12.
- López, R.O.A., González-Garduño, R., Ororio, A.M.M., Aranda, I.E. & Díaz, R.P. (2013). Cargas y especies prevalentes de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo destinados al abasto. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4:223-224.
- López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., Liébano-Hernández, E. (2010). Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos rumiantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. *Folleto Técnico*, 8:11-15.
- Luck-Montero, R., Avendaño-Reyes, L., Ail-Catzim, C.E., Cuéllar-Ordaz, J., Muñoz-Tenería, F. & Macías-Cruz, U. (2018). Actividad ovicida y larvicida de extractos acuosos de *Pluchea sericea* y *Artemisia tridentata* en *Haemonchus contortus*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13).
- Maguire, R., Kunc, M., Hyrsl, P. & Kavanagh, K. (2017). Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae.

- Neurotoxicol. Teratol.*, 64:37-44. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.002>.  
ISSN 0892-0362.
- Martínez, C.D. & Ramírez J.J. (2016). Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México. Hacia un enfoque integral de la producción, la dieta, la salud y la cultura en beneficio de la sociedad. San Luis Huexotla, Texcoco, México: Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP.
- Martínez-Miranda, D.N. (2014). Producción de tres especies de *Pleurotus* spp. utilizando diferentes sustratos. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. Tesis.
- Mata, G., Salmones, D. & Savoie, J.M. (2017). Enzimas lignocelulíticas de *Pleurotus* spp. En: Sánchez, J.E., D. Royse (Eds.). La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. El Colegio de la Frontera Sur., ECOSUR., Tapachula. Pp.: 17-25.
- Medina, P., Guevara, F., La, M., Ojeda, N. & Reyes, E. (2014). Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*, 37(3): 257-263.
- Mehlhorn, H. (2008). Haemonchosis. *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 1703-1737.
- Millares, P. (2010). Proteomic fingerprinting to identify markers for monitoring anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. University of Liverpool. Inglaterra. Tesis.
- Min, H., Kawasaki, I., Gong, J. & Shim, Y.H. (2015). Caffeine induces high expression of cyp-35A family genes and inhibits the early larval development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cells.*, 38:236-242.

- Morales-Nava, G. (2020). Fortalecimiento de unidades de producción familiar para el cultivo de hongos setas, bajo ambiente controlado, como contribución a la economía familiar, en el municipio de San Pablo Huitzo, en el Estado de Oaxaca, México. Instituto Politécnico Nacional. Tesis.
- Montañez-Palma, L.F., Téllez-Téllez, M., Acosta-Urdapilleta, M.deL., Díaz-Godínez, G. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Nematicidal activity of a hydroalcoholic extract of the edible mushroom *Neolentinus ponderosus* on L<sub>3</sub> larvae of *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitologica*.
- Monjurul, H. (2019). Histopathological and hematological studies on *Haemonchus* spp and *Paramphistomum* spp infections in sheep and goats at different abattoirs in Chattogram metropoliton área. Chattogram Veterinary and Animal Sciences University. Bangedesh. Tesis.
- Moreno-García, S.F. (2013). Evaluación *in vitro* de la resistencia a benzimidazoles de la cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino aislada y mantenida en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Universidad Autónoma de México. Tesis.
- Mphahlele, M., Molefe, N., Tsotetsi-Khambule, A. & Oriel, T. (2019). Anthelmintic resistance in livestock. In: *Helminthiasis*, Intech Open. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.87124>.
- 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.
- Muez, M.A. & Pardo, J. (2002). La preparación del sustrato. En: J.E. Sánchez y D.J. Royse (Eds.). *La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp*. El Colegio de la Frontera Sur (Ecosur), Limusa–Grupo Noriega Editores. México, D.F. Pp.: 159-186.

- Nieto, I.J. & Chegwin, A.C. (2010). Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. Universidad Nacional de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XII (1): 169-178.
- Oropeza-Guerrero, M.P. (2017). Productividad y actividad antioxidante de cepas silvestres, reconstituidas e híbridas de *Pleurotus djamor*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México. Tesis.
- Páez-León, S.Y., Carrillo-Morales, M., Gómez-Rodríguez, O., López-Guillén, G., Castañeda-Ramírez, G.S., Hernández-Núñez, E., Wong-Villarreal, A. & Aguilar-Marcelino, L. (2022). Actividad nematocida del extracto de hoja de *Moringa oleífera* Lam. contra *Haemonchus contortus* y *Nacobbus aberrans*. *Revista de Helminología*, 96, E13.
- Páez-León, S.Y. (2021). Fraccionamiento químico biodirigido de los extractos orgánicos del sustrato agotado del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* con actividad nematocida. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. Tesis.
- Páez-León, S.Y. (2018). Actividad nematocida de extractos de sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* y *Moringa oleífera* contra nematodos de importancia agropecuaria. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Jiutepec, Morelos. Tesis.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.*, 5:53-63.
- Picornell, M.R.; Pardo-Jiménez, A.; Navarro, M.J. & Gea, F.J. (2017). Actualizaciones sobre la preparación del sustrato para cultivar setas *Pleurotus* spp. En: J.E. Sánchez y D.J. Royse (Eds.). *La biología, el cultivo y las*

- propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. El Colegio de la Frontera Sur.
- Pineda-Alegría, J.A., Sánchez, J.E., Ventura-Zapata, E., González-Cortazar, M. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Nematicidal effect of Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts against *Haemonchus contortus*. *J. Med. Food.*, 24(9):953-959.
- Pineda-Alegría, J.A., Sánchez, J.E., González-Cortazar, M., Von Son-de Fernex, E., González-Garduño, R., Mendoza-de Gives, P., Zamilpa, A., Aguilar-Marcelino, L. (2020). *In vitro* nematocidal activity of commercial fatty acids and  $\beta$ -sitosterol against *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*, 94: e135
- Pineda-Alegría, A., Sánchez-Vázquez, J, E., González-Cortazar, M, Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Cuevas-Padilla, E.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. (2017). The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 20(12): 1184-1192. Doi: 10.1089/jmf.2017.0031.
- Pineda-Alegría, J.A., Sánchez, J.E., 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  $\beta$ -sitosterol against *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*, 94: e135.
- Pineda-Alegría, J.A. (2019). Actividad nematicida de *Physalis peruviana* y *Lentinula edodes* y la identificación de grupos activos. Instituto Politécnico Nacional. Tesis.DOI:10.1089/jmf.2020.0168.URI:http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/27346.
- Pineda-Alegría, J.A. (2016). Evaluación *in vitro* de una fracción metanólica del hongo *Pleurotus djamor* (0123) contra huevos y larvas (L<sub>3</sub>) del nematodo parásito *Haemonchus contortus*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Jiutepec, Morelos, México. Tesis.

- Portillo, V., Jagannathan, S. & Wolstenholme, A.J. (2003). Distribución de subunidades del canal de cloruro activado por glutamato en el nematodo parásito *Haemonchus contortus*. *J. Comp. Neurol.*, 462: 213e222.
- Puttaraju, N.G., Venkateshaiah, S.U., Dharmesh, S.M., Urs, S.M. & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26): 9764-9772.
- 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. Pp.:141-156.
- Quintero-Elena, Z.J., Aguilar-Marcelino, L., Castañeda-Ramírez, G.S. & Gómez-Rodríguez, O. (2022). *In vitro* and micro-plot predatory activity of the mite *Caloglyphus mycophagus* against populations of nematode larvae of agricultural importance. *Biological Control*, 165:104813.
- Rai, G., Ganeshpurkar, A., Bhadoriya, S. & Pardhi, P. (2012). Investigation of anthelmintic potential of oyster mushroom *Pleurotus florida*. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(4):539.
- Ramírez-Correa, A.A. (2014). Inhibición migratoria y actividad sobre larvas enquistadas de *Toxocara canis* de un producto formulado a base de Ivermectina de liberación controlada en ratones de la cepa CD-1 con infección inducida. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis.
- Reyes-Guerrero, D.E., Agustín Olmedo-Juárez, A. & Mendoza-de Gives, P. (2021). Control y prevención de nematodosis en pequeños rumiantes: antecedentes, retos y perspectivas en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12 (Supl 3):186-204.
- Rew, R.S. & Fetterer, R.H. (1986). Modo de acción de los fármacos antinematodos. En: Campbell, WC, Rew, RS (Eds.), *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Pp. 321e337 (Capítulo 16).

- Rinaldi, L., Catelan, D., Musella, V., Cecconi, L., Hertzberg, H., Torgerson, P.R. & Cringoli, G. (2015). *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospatial Health*, 19(2), 325-331. Doi: 10.4081/gh.2015.355.
- 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.
- Rodríguez-Vargas, C.F. (2006). Control de haemonchosis en caprinos. *Agronomía Mesoamericana*, 17: 79-88.
- Rodríguez-Barrera, T.M., Téllez-Téllez, M., Sánchez-Vázquez, J.E., Castañeda-Ramírez, G.S., Acosta-Urdapilleta, M.L., Bautista-Garfias, C.R. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Edible mushrooms of the genus *Pleurotus* as biocontrol agents of parasites of importance for livestock. *Scientia Fungorum*, 52, e1375.
- Rodríguez-Gómez, A. (2016). Actividad ovicida y larvicida *in vitro* del extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha* en *Haemonchus contortus*. Universidad Autónoma de México. Tesis.
- Rodríguez-Labastida, M. (2019). Evaluación nematicida *in vitro* de filtrados obtenidos a partir de hongos hematófagos cultivados en medios elicitados con extracto larval del parásito *Haemonchus contortus*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY). Mérida, Yucatán, México. Tesis.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi L., Pérez de León, A.A., Silva-Villela, H., Torres-Acosta, J.F., Fragoso-Sánchez, H., Romero-Salas, D., Rosario-Cruz, R., Saldierna, F. & García-Carrasco, D. (2017). Potencial economic impact assessment for cattle parasites in México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1): 61-74.
- Rodríguez-Vivas, R.I., & Cob-Galera, L.A. (2005). Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. 2da. Edición. Ediciones de la Universidad

- Autónoma de Yucatán. Mérida, México. Pp. 41-51. ISBN: 9709680458, <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000049652>.
- Salmones, D. (2017). *Pleurotus djamor*, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. *Revista Mexicana de Micología*, 46. ISSN 0187-3180.
- Salmones, D., Mata, G., Gaitán-Hernández, R. & Ortega, C. (2020). Cepas de *Pleurotus pulmonarius* con alta capacidad productiva seleccionadas de micelios dicarióticos. *ScientiaFongorum*, 50: e1270.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5):1321-1337.
- Sánchez, J. & Royse, D. (2002). La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F., MX, Editorial Limusa, S.A. Pp.: 290.
- Sánchez-Salgado, S.F., Castañeda-Ramírez, G.S., Sánchez, J.E., Gómez-Rodríguez, O., Morales-Soto, I. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Actividad nematocida *in vitro* de tres cepas de hongos comestibles de *Pleurotus* spp. contra *Haemonchus contortus* (L<sub>3</sub>) y *Nacobbus aberrans* (J2). Nematicidal activity *in vitro* of three strains of edible mushrooms *Pleurotus* spp. against *Haemonchus contortus* (L<sub>3</sub>) and *Nacobbus aberrans* (J2). *IBCIENCLAS*, 4 (1): 9-13.
- Sangster, N.C., Cowling, A. & Woodgate, R.G. (2018). Ten events that defined anthelmintic resistance research. *Trends in Parasitology*, 34(7): 553-563. Doi 10.1016/j.pt.2018.05.001.
- Saccareau, M., Sallé, G., Robert-Granié, C., Duchemin, T., Jacquiet, P., Blanchard, A., Cabaret, J. & Moreno, C.R. (2017). Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasit. Vectors*, 10, 201. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2131-7>.

- Satou, T., Kaneko, K., Li, W. & Koike, K. (2008). The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 574-576. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.574>.
- Selemon, M. (2018). Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. *J. Vet. Med. Res.*, 5(5):1139.
- Soca, M., Roque, E., Soca, M. (2005). Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*, 28(3): 175-185.
- Stadler, M., Anke, H. & Sterner, O. (1993). Linoleic acid-the nematicidal principle of several nematophagous fungi and its productions in trap-forming submerged cultures. *Archives of Microbiology*, 169: 401-405.
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2015). Parasites of sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 4a edición, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, United Kingdom: Wiley Blackwell. Pp. 353-436. ISBN: 9780470671627.
- Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., González-Pech, P.G., Mancilla-Montelongo, M.G., Ortega-Pacheco, A., Aguilar-Caballero, A.J., Santos-Ricalde, R.H., Sarmiento-Franco, L.A., Ramos-Bruno, E., Torres-Fajardo, R.A. & Méndez-Ortíz, F.A. (2021). Interacción entre la nutrición y los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes pastoreando la selva baja caducifolia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(27).
- Torres-Acosta, F., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A. & Sandoval-Castro, C. (2014). Uso de agujas de óxido de cobre para el control de nematodos gastrointestinales. En: Tecnología en Apoyo a los Productores de Caprinos. Edición: 1, Editor: SPC, Editores: Leonel Martínez Rojas. Pp. 95-99. [www.cnsp.caprinos.org.mx](http://www.cnsp.caprinos.org.mx)
- Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R. & Alonso-Díaz, M.A. (2012). Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal

- nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 103(1). Pp.: 28-40.
- Torres-Acosta, J.F., Rodríguez-Vivas, R.I. & Cámara-Sarmiento, R. (1995). Efecto del parto sobre la eliminación de huevecillos de nematodos y ooquistes de *Eimeria* en cabras criollas. *Revista Biomédica*, 6: 208-215.
- Torres-Vásquez, P., Prada-Sanmiguel, G.A., Márquez-Lara, D. (2007). Resistencia antihelmíntica en los nematodos gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 13:59-76.
- Vázquez, P.V.M., Flores, C.J., Santiago, V.C., Herrera, R.D., Palacios, F.A., Liébano, H.E. & Pelcastre, O.A. (2004). Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria en México*, 42(2): 237-245. Doi: 10.22319/rmcp.v42i2.1414.
- Veglia, F. (1916). The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud). Onderstepoort, South Africa: *Veterinary Research Laboratories*.
- Vázquez, V.M. (2000). Agentes etiológicos y ciclos de vida de los nemátodos gastrointestinales. En: Memorias 1er. Curso Internacional “Nuevas perspectivas en el diagnóstico y control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes”. (Eds. F. Torres, A. Aguilar & A. Ortega). Yucatán, México.
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.*, 206 (3-4):322-327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>.
- Valdez-Uriostegui, L.A., Sánchez-García, A.D., Zamilpa, A., Sánchez, J.E., González-Garduño, R., Mendoza-de-Gives, P., Castañeda-Ramírez, G.S.,

- González-Cortazar, M. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). *In vitro* evaluation of hydroalcoholic extracts of mycelium, basidiomata and spent substrate of *Pleurotus ostreatus* against *Haemonchus contortus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24: 62.
- Vieira, M.T., Fonseca, L.D., Morais, C.F., De Oliveira, V.V., Silva, M.L.F., Morais-Costa, F. & Duarte, E.R. (2017). Control of *Haemonchus contortus* in sheep using basidiocarps of *Agaricus blazei* Murril. *Veterinary Research Communications*, 41(2): 99-106.
- 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. Doi: 10.14202/vetworld.2018.921-925
- Wyk, V.J.A. & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide, Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research*, 80(1).
- Yang, Y., Guo, X., Zhang, H., Huang, Y., Chen, X. & Du, A. (2017). Characterization of the development of *Haemonchus contortus* ZJ strain from gerbils. *Parasites and Vectors*, 10(1).
- Zhang J, Meng G, Zhai G, Yang Y, Zhao H, & Jia L. 2016. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*; 82, 432–439.
- Zapata, S.R., Velásquez., V.R., Herrera, O.L.V., Ríos, O.L. & Polanco, E.D.N. (2016). Prevalencia de nematodos gastrointestinales en sistemas de producción ovina y caprina bajo confinamiento, semiconfinamiento y pastoreo en Municipios de Antioquia, Colombia. *Investigaciones Veterinarias Perú*, 27(2): 344354.

## **12. DICTIOGRAFÍA**

<https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-zacatecas/farmacologia/antihelminticos-resumen-farmacologia-humana/6120366>

Fecha de consulta: 18 de mayo, 2023.

<http://www.cerzosconicet.gov.ar/BoletinCERZO/2009-16/sabia.htm>

Fecha de consulta: 11 de abril, 2023.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura/símbolo	Significado
$\alpha$	Alfa
A	Fracción acuosa
AE	Fracción de acetato de etilo
AH	Antihelmínticos
AN	Actividad nematicida
ATP	Adenosin trifosfato
B	Fracción butanol
$\beta$	Beta
CB	Control biológico
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva al 50%
CE <sub>90</sub>	Concentración efectiva al 90%
°C	Grados Celsius
CN	Compuestos nematicidas
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sulfato cérico
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
CPF	Cromatografía en placa fina
CuO <sup>-</sup>	Ión óxido de cobre
Cu <sup>-</sup>	Ión cobre
cm	Centímetro
DL <sub>50</sub>	Dosis letal al 50%
DL <sub>90</sub>	Dosis letal al 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Eficiencia biológica
EC.	Ecuación
EE	Extracto etanólico concentrado
E.E.U.U.	Estados Unidos de América
EHA	Extractos hidroalcohólicos
FDA	<i>Food Drugs Administration</i>
GABA	Acido gama amino butírico
Glu	Glutamato
g	Gramo
$\delta$	Delta
h	Hora
H	Fracción de hexano
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico

HN	Hongo nematófago
HR	Humedad relativa
IEH	Inhibición de eclosión de huevos
IMT	Inhibidores microtubulares
IM	Inhibición de la motilidad
IML <sub>3</sub>	Inhibición de la mortalidad de larvas infectantes
IVM	Ivermectina
J2	Larvas juveniles del segundo estadio
Kg	Kilogramo
L	Litro
L <sub>3</sub>	Larvas infectantes
LM	Lactonas macrocíclicas
min	Minuto
mg	Miligramo
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ML	Mortalidad de larvas
ML <sub>3</sub>	Mortalidad de larvas infectantes
MR	Muestra de referencia
NA	Nematodo adulto
nm	Nanómetro
n	Células uninucleadas
n+n	Micelio secundario
NA	Nematodo adulto
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NGI	Nematodos gastrointestinales
NI	Neurotransmisores inhibidores
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
PC	Pared celular
PD	Papa dextrosa
PdAct	<i>Pleurotus djamor</i> acetato de etilo
PM	Peso molecular
Pgp	Proteína transportadora transmembrana
PdAcO	Fracción acuosa de <i>Pleurotus djamor</i>
PdAct	Fracción de acetato de etilo de <i>Pleurotus djamor</i>
RA	Resistencia antihelmíntica
rpm	Revoluciones por minuto
Rf	Retención frontal
SD	Sustrato degradado
SDP	Sustrato degradado de <i>Pleurotus</i>
SDPd	Sustrato degradado de <i>Pleurotus djamor</i>

SEsm	Sustrato estéril sin micelio
SPS	Sustrato estéril de <i>Pleurotus</i>
SPS1	Sustrato degradado de <i>Pleurotus</i> primera cosecha
SPS2	Sustrato degradado <i>Pleurotus</i> segunda cosecha
SPdS1	Sustrato degradado de <i>Pleurotus djamor</i> primera cosecha
SPdS2	Sustrato degradado <i>Pleurotus djamor</i> segunda cosecha
SDPdT2-2	Sustrato degradado de <i>P. djamor</i> del tratamiento T2 segunda cosecha de basidiomas
SDPdT5-2	Sustrato degradado de <i>P. djamor</i> del tratamiento T5 segunda cosecha de basidiomas
SA	Sustrato agotado
SEsm	Sustrato estéril sin micelio
SEsm-T2	Sustrato estéril sin micelio del tratamiento T2
SEsm-T5	Sustrato estéril sin micelio del tratamiento T5
SLO <sup>-1</sup>	Receptor inhibitorio
T2	Tratamiento T2
T5	Tratamiento T5
TP	Tasa de producción
TR	Tiempo de retención
µg	Microgramo
v: v	Volumen: volumen

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b>	Aspectos morfológicos de las larvas L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> y L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> . 10
<b>Figura 2</b>	Ciclo biológico de <i>H. contortus</i> en ovinos. L = Larvas; L <sub>1</sub> -L <sub>3</sub> = Larvas juveniles de vida libre; L <sub>4</sub> -L <sub>5</sub> (pre-adultas) = Larvas parásitas. 14
<b>Figura 3</b>	Estructura química de la Ivermectina. 18
<b>Figura 4</b>	Componentes de un microtúbulo celular. 19
<b>Figura 5</b>	Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> sp. (A) Basidiosporas haploides (n), (B) Micelio primario haploide (n), (C) Micelio secundario dicariótico (n+n), (D) Cuerpo fructifero, (E) Basidios. 25
<b>Figura 6</b>	Componentes de la pared celular vegetal. 26
<b>Figura 7</b>	Basidiomas de <i>Pleurotus djamor</i> var. <i>Salmonustramineus</i> creciendo en paja de cebada. 28
<b>Figura 8</b>	Procedimiento general para la obtención de metabolitos con actividad nematocida de <i>P. djamor</i> y obtención de larvas infectantes de <i>H. contortus</i> . L <sub>3</sub> = Larvas infectantes; SD= Sustrato degradado; CG-EM= Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas; CPF = Cromatografía en Placa Fina. 32
<b>Figura 9</b>	Instituciones donde se realizó la presente investigación: (A) CIB-UAEM; (B) CENID-SAI INIFAP; (C) CIBIS-IMSS; (D) ECOSUR. 34
<b>Figura 10</b>	Sustratos secos. (A) SD de <i>P. djamor</i> ; (B) SEsm. 38
<b>Figura 11</b>	Molino convencional para la obtención de polvos de los SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5. 38
<b>Figura 12</b>	Proceso de maceración para obtener los extractos etanólicos. (A) Muestra del sustrato; (B) Maceración del sustrato; (C) Recuperación de las fases líquidas de los sustratos; (D) Liofilización de los extractos. 39
<b>Figura 13</b>	Etapas del proceso por bipartición para obtener las fracciones del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5. (A) Separación en embudo de vidrio; (B) Concentración en rotavapor; (C) Secado por liofilización. 41
<b>Figura 14</b>	Etapas de la técnica <i>in vitro</i> de inhibición de la motilidad de larvas para cuantificar los %ML <sub>3</sub> . (A) Peso de los 43

	extractos; (B) Diluciones de los extractos etanólicos y las fracciones, de T2 y T5; (C) Placa de microtitulación con la prueba <i>in vitro</i> .	
<b>Figura 15</b>	Representación esquemática de la confrontación <i>in vitro</i> para cuantificar los %ML <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> en el grupo testigo y en las cinco concentraciones de la fracción de AE de SD de <i>P. djamor</i> y SE (sustrato estéril sin micelio), de T2.	46
<b>Figura 16</b>	Representación de la confrontación <i>in vitro</i> para evaluar la actividad nematocida de las reuniones obtenidas por CPF del SDT2-AEC de <i>P. djamor</i> y SEsmT2-AEC contra L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> . (A) Prueba <i>in vitro</i> ; (B) Observación al microscopio óptico (40X).	48
<b>Figura 17</b>	Extractos etanólicos concentrados y fracciones obtenidas por bipartición, de T2 y T5. (A) SD de <i>P. djamor</i> , T2; (B) SD de <i>P. djamor</i> , T5; (C) SEsm, T2; (D) SEsm, T5.	52
<b>Figura 18</b>	Prueba visual de solubilidad de algunas fracciones de los extractos etanólicos concentrados de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5. (A) Insoluble; (B) Baja solubilidad; (C) Soluble.	55
<b>Figura 19</b>	Efecto de los grupos testigo y diferentes concentraciones de la fracción de SDT2-AE de <i>P. djamor</i> en el %ML <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .	62
<b>Figura 20</b>	Efecto de los grupos testigo y diferentes concentraciones de la fracción de SEsmT2-AE en el %ML <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .	63
<b>Figura 21</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 9-13 del SDT2-AEC (“R4”) de <i>P. djamor</i> obtenidas en un sistema de elución 70:30 hexano: acetato de etilo. (A) Revelador de sulfato cérico (CeSO <sub>4</sub> ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C:365 nm).	64
<b>Figura 22</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 17-20 de SDT2-AEC (“R6”) de <i>P. djamor</i> obtenidas con diclorometano al 100%. (A) Revelador para flavonoides; Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C: 365 nm).	64
<b>Figura 23</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 7-8 del SEsmT2-AEC (“R3”), obtenidas en un sistema de elución: agua-acetonitrilo (50:50). (A) Revelador de sulfato cérico (CeSO <sub>4</sub> ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C:365 nm).	65

<b>Figura 24</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos por CPF de las reuniones 12-15 de SEsmT2-AEC (“R5”), obtenidas en un sistema de elución: agua:acetonitrilo (50:50). (A) Revelador de sulfato cérico (CeSO <sub>4</sub> ); Visualizadas por luz UV (B: 254 nm; C: 365 nm).	65
<b>Figura 25</b>	Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R4” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SDT2 de <i>P. djamor</i> . Clave: SDPdT2-AEC-R4.	70
<b>Figura 26</b>	Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R6” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SDT2 de <i>P. djamor</i> . Clave: SDPdT2-AEC-R6.	71
<b>Figura 27</b>	Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R3” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SEsmT2. Clave: SEsmT2-AEC-R3.	72
<b>Figura 28</b>	Cromatograma obtenido mediante CG-EM de la reunión “R5” seleccionada por CPF, colectada en una columna de fase reversa del SEsmT2. Clave: SEsmT2-AEC-R5.	73
<b>Figura 29</b>	Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R4” (SDPdT2-AEC-R4) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SDT2 de <i>P. djamor</i> .	74
<b>Figura 30</b>	Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R6” (SDPdT2-AEC-R6) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SDT2 de <i>P. djamor</i> .	75
<b>Figura 31</b>	Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R3” (SEsmT2-AEC-R3) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SEsmT2 de <i>P. djamor</i> .	76
<b>Figura 32</b>	Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de referencia para evaluar la reunión “R5” (SEsmT2-AEC-R5) obtenida por CPF de la fracción de AE colectada en columna de fase reversa del SEsm-T2.	78
<b>Figura 33</b>	Estimación de la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> y CE <sub>90</sub> ) del SDT2-AE de <i>P. djamor</i> sobre la ML <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .	88
<b>Figura 34</b>	Estimación de la concentración efectiva (CE <sub>50</sub> y CE <sub>90</sub> ) del SEsmT2-AE sobre la ML <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .	88

---

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1</b>	Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes. 15
<b>Cuadro 2</b>	Compuestos bioactivos en especies de <i>Pleurotus</i> con actividad nematicida. 21
<b>Cuadro 3</b>	Porcentaje de insumos lignocelulósicos usados para obtener los SD de <i>P. djamor</i> de T2 y T5. 36
<b>Cuadro 4</b>	Sustratos evaluados de los tratamientos de T2 y T5. 36
<b>Cuadro 5</b>	Concentraciones del grupo testigo (positivo y negativo) y de los extractos etanólicos concentrados y las fracciones de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2, para evaluar el efecto nematicida <i>in vitro</i> sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> . 45
<b>Cuadro 6</b>	Rendimiento (g) de extracción de los extractos etanólicos obtenidos por maceración del SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5. 51
<b>Cuadro 7</b>	Fracciones de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5, obtenidas por bipartición con disolventes de diferente polaridad a partir de los extractos etanólicos concentrados. 52
<b>Cuadro 8</b>	Rendimiento (g) de extracción de las fracciones de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5, obtenidas a partir de los extractos etanólicos concentrados. 53
<b>Cuadro 9</b>	Solubilidad en cuatro disolventes que presentaron los extractos etanólicos concentrados y sus fracciones obtenidas por bipartición a partir de SD de <i>P. djamor</i> y SEsm, de T2 y T5. 54
<b>Cuadro 10</b>	Mortalidad (%) promedio de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> confrontadas contra el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL <sup>-1</sup> n =6, 72 h, 28 °C) del SD de <i>P. djamor</i> de T2 y T5. 57
<b>Cuadro 11</b>	Mortalidad (%) promedio de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> confrontadas contra el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL <sup>-1</sup> , n =6, 72 h, 28 °C) del SEsm de T2 y T5. 58
<b>Cuadro 12</b>	Mortalidad (%) promedio de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> en el extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL <sup>-1</sup> , n =6, 72 h, 28 °C) del SD de <i>P. djamor</i> de T2 y T5. 60
<b>Cuadro 13</b>	Mortalidad (%) promedio de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> en el 61

extracto etanólico concentrado y las fracciones obtenidas por bipartición (20 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) del SEsm de T2 y T5.

- Cuadro 14** Mortalidad (%) promedio de L<sub>3</sub> de *H. contortus* de las 67 reuniones (5 mg mL<sup>-1</sup>, n =6, 72 h, 28 °C) obtenidas por CPF de la fracción de AE de SD de *P. djamor* y SEsm, de T2, colectadas en columna.
- Cuadro 15** Reuniones obtenidas por CPF a partir de las fracciones 68 colectadas por cromatografía en columna de fase reversa del SD de *P. djamor* y SEsm, de T2.
- Cuadro 16** Estimación mediante el método PROBIT de la 80 concentración efectiva (CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub>) del SDT2-AE de *P. djamor* y SEsmT2-AE con actividad nematocida (72 h) sobre la ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.
- Cuadro 17** Compuestos elucidados por cromatografía de gases- 82 espectrometría de masas de la reunión de SDT2-AEC-“R6” de *P. djamor*.
- Cuadro 18** Compuestos elucidados por cromatografía de gases- 83 espectrometría de masas de la reunión de SEsmT2-AEC-“R3” de *P. djamor*.
- Cuadro 19** Compuestos elucidados por cromatografía de gases de la 84 reunión de SEsmT2-AEC-“R5” de *P. djamor*.
- Cuadro 20** Estimación mediante el método PROBIT de la 87 concentración efectiva (CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub>) del SDT2-AE de *P. djamor* y SEsmT2-AE con actividad nematocida (72 h) sobre la ML<sub>3</sub> de *H. contortus*.
-



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO  
Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO  
PROFESORA-INVESTIGADORA DEL INSTITUTO  
DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS (INIFAP)

Por este medio me complace notificarle que ha sido designada como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Maura Téllez Téllez, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

#### Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:03:01 | FIRMANTE

khdYcL1tjor7q/NuNecS7zOKz5JsfS7D5J3wGImnE8YyxPZJ9k+SFAHU5CFbfnSyy81wqm67p2CbGBBXeAzVWgTP712FUxR1NxvT1gKRT31J1Pr6LkW1RpVpc/64N6NyLLFF  
QdxARi4bXaK+gBW0nZ5DZi3f1ruzmW//0rp3lx83cQ3qflKrD4/853GrVp1z+z6pbT3LeU2LFTj02p6jKJbFneBkkbEqD0Gucy/umqjXz6ARWgjeSNSD2vTKoONBE1Cw2WWezIvdB  
mtePlyPxxOGBUdTGXcQ/1QE4mVdV112XXBJLTOFr9oGC1hQgV+d+y/kXX/eQrJzxcfw--



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

[JNr5w0gbK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZPwNbl2Uaww6nKAdFwKGdk73D19KTz>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA  
PROFESORA-INVESTIGADORA DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS.

Por este medio me complace notificarle que ha sido designada como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Maura Téllez Téllez, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:02:56 | FIRMANTE

Xg7kDd9W68yK3TRahDlgaQdzRyvVAhO9ybealX212+QGjxVo5zigi9nAbMaXrBpxkQJLEdoGiNblRruAFGRnnPBO1Gf1qTwEWGEVcww3INCMVdmdU594xCh6eQHtBwD3QAT  
Q2v5sUIN4HkvQPoy1o3F12Xgp47DdiLowB4h4PVsVtIOQqgNX0Atv5kqcrVhjuCS2F4jzlQovv3ACGtRsFlnJZZORaNU8Ayqpm5yoTNILireR0iKgjxoQfrgBsAj/FmwsHOrm/vzsU6/  
93wuNGDnuAAzb1F/UxRyxQhNywihKRicnNGKaQXa10iRck/sx7fU5MZNp2q1ajc+r24GxQ==



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

[fvk1tNiq8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WHfUPZTBepGWdO3Cxnel0bONXLX5bSjF>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE  
INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS  
UAEM

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ  
PROFESORA-INVESTIGADORA DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS.

Por este medio me complace notificarle que ha sido designada como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo su dirección, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:02:51 | FIRMANTE

JEqVhnOrOkj8DNTdRYUYSwRCIuc9WIUH088llqLAluO3Yoy0d5K5fJesP2BoEQ2TbSNMvCJDV+On5TE5CamzOIdwMFIg8dRoTeshBw0G0VkoRDPovRkroRseafjYF2257zmz4ps+AeDBtU9qGHrO7zPWLWeeYRqyCCM1qafI0cSvmbdCTONeRmxNqsfPZmOs5O7RRRCZDY62+gy3KUMR/p7KaXCUF2QKUAJZSPg23v4a+h4GR1Q9dqQWU9CdQJIMtGRUnHc8SulojX2rfvo4KggblDvZD/et+b2gG1svIpeFksp1Oe2SNj8I94dX7w04knWeAW+fdgkDY7IDRA--

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



mUYO9ELit

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vnWa2sXRTh06JTywK34erWzknBpJFnBQ>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DR. MANASES GONZÁLEZ CORTAZAR  
PROFESOR-INVESTIGADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL SUR (CIBIS) IMSS

Por este medio me complace notificarle que ha sido designado como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Maura Téllez Téllez, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:03:04 | FIRMANTE

WS/VZLH8DwzA52JrIUkM4ukwXAsxtrPk4JBCYtsewMDq2yztJ7Kvq9n1XDP3k02X59t8cdUhu4KP13RcKQsE25pVaCAUCkmzY88ABH+Uxl2v1WbwXeJKX8qErjJZAdAGlc0qnM  
KRWm1N3FwPJBGrpGSmLznmxK9VcKa7xNErGLKsvqQ8K0e5xdDnLNIE5mbOmPmHGZySUBYFGE8dvyWpW5NsgdisskRgcXreyvVGMtTnP9HJDWTfyz+HikxvdiP0PXyE  
UAJmjhEwQgOLc92VoXkkWDPxiD6vZzyFID5ADyA1n+3XV82NODrfgjxxoDf9yF/SJ9tg--

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



GBhbfHSJU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudIo/La1Nqs4TJsvIKu0SdgIXeBD5KaHxByB>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DR. ALEJANDRO GARCÍA FLORES  
PROFESOR-INVESTIGADOR DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS.

Por este medio me complace notificarle que ha sido designado como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Maura Téllez Téllez, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:03:07 | FIRMANTE

SRBYhr2o1/DkxE4mVHvJwQd7JU33ujbRy//lqYS+MoZbxNN+twy7IIUpn3Cs6+jdyL3fF+K94XqJEkX6LftKwzOMxSeT64yiDgv3gu1gSbVsnlyAE6PrBS6CxcgHb1dRYG5jqM1cSH  
VwqkQC377PeXxdZ0TMrT8EclOMRRhF4SPs1lp1UuY/EBdOnkD6T3QCk86Uchx+Ud2RNLyrlIWmnTQ7BFcqt9EX+uyeG0v9AHiqcVbvAZonc40PqXuerChpjAy0BG3YTwhgC  
MLNApeN9sU9WgnbtqAReS4kbEu0vsZQXY7K3qOuDP7WLk6TS2lqXMGTKJ/MgN0TcSGcJg==

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



[VCKEi9nDH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nlabLIZz5yjjrooDbhbXKibMAhp5XmWzz>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Cuernavaca, Mor., a 05 de junio del 2025

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA  
PROFESOR-INVESTIGADOR DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS.

Por este medio me complace notificarle que ha sido designado como parte del Comité Revisor para el trabajo de tesis, que presenta la alumna **IBT. MARIA VICTORIA BENAVIDES AGUILAR**, bajo el título "ESTUDIO MICOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE DOS EXTRACTOS ORGÁNICOS (T2 Y T5) DEL SUSTRATO DEGRADADO DE *Pleurotus djamor* CONTRA *Haemonchus contortus* (L3)", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Maura Téllez Téllez, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Manejo de Recursos Naturales.

Asimismo, usted contará con 20 días hábiles para entregar la respuesta de la revisión de la tesis una vez que la haya recibido por parte de la alumna.

Sin otro particular, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO**  
Coordinador de la Maestría en Manejo  
de Recursos Naturales del CIB



C.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RUBEN CASTRO FRANCO | Fecha:2025-06-05 18:02:59 | FIRMANTE

HGI7rocd1bYp/6HIEUQAumpFmewwAgFaBo4d+gcdqDH9y1AhPVrKLW0SmEPyqs8s82NQno0nNLdBuxqiA0SOa/dSkiDIZ1ztB2NerHqFIE4rcLKvMORbLQTD+i32tke0HIITNh4  
nsdwBONGTmJ6g8uUfg2T8rP1YvUcoaQWeh08Z89GyG1fBjUtjODMPVv6UeLniEI97Au07PeCa1w2zMpvaF6oUkbiXs8dCWzYh9m71Jmclb0ogHIL4Wie+2eP3edBZqsVzxb28B  
pAXIG8+pD7g7G+oVCBgoO+89mfEIDNPFVEN1Mup6hWXN1tYSHR3/mgrqKBG7nQMg5Zj6fsA==

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



[FeqtKMEB4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/x2YRfCrkfk6nSGxKZY08UUEa4NCfp3yh>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029