



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN
DE UN MODELO *in vivo*

TESIS

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

P R E S E N T A

BIÓL. REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO

DIRECTORA: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

CO-DIRECTORA: DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO DEL 2023





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN
DE UN MODELO *in vivo*

TESIS

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

P R E S E N T A

BIÓL. REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO

DIRECTORA: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

CO-DIRECTORA: DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO DEL 2023



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (N.º de apoyo 793587), financiamiento que ayudó a llevar a cabo los estudios de maestría durante dos años y la culminación del presente proyecto.

A nuestra máxima casa de estudios la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por albergarme durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas por darme la oportunidad de formar parte del alumnado de la Maestría en Manejo de Recursos Naturales.

A los profesores, administrativos y secretariado en especial a la Q.I. Romelia o como todos les decimos Romi quien me ha apoyado con mucho cariño y paciencia en todo este proceso y a cada persona que hizo más llevadero estos dos años.

Al CENID-SALUD ANIMAL E INOCUIDAD del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por abrir las puertas para realizar diversas actividades.

Al Instituto de Salud Pública (INSP) por permitirnos realizar las pruebas con los ratones. Al jefe de Departamento de Bioterio el MVZ. Luis Fabian Téllez Figueroa y al Biol. Julio Zaragoza Juárez por la amabilidad y atención brindada en dicho momento.

A mi directora de tesis la Dra. Maura Téllez Téllez por darme la oportunidad de ser su tutorada, por la confianza que me brindó para llevar a cabo este proyecto y por todo el tiempo compartido. Gracias por el conocimiento brindado, por cada palabra que me motivó a seguir adelante, por exigirme cada día más y por cada regaño que me forjaron como maestra. ¡Muchas gracias Doc.!

A mi codirectora la Dra. Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta por motivarme y ayudarme a ingresar a la maestría, porque sin usted no estaría aquí. Gracias por todo el apoyo que me ha brindado no solo en lo académico sino también en lo personal. Gracias por ser la pionera en mis conocimientos sobre el peculiar mundo de los hongos, por resolver cada

duda por mínima que fuera y por siempre apoyarme incondicionalmente. ¡Miss muchas gracias!

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino por fungir como síndico del comité evaluador. Gracias por su valioso apoyo, comentarios y sugerencias que fueron base para que este proyecto de tesis saliera a flote. Gracias por compartir su conocimiento, por enseñarme a trabajar en equipo y por siempre tener la disposición de ayudarnos. Quiero agradecer a su equipo de trabajo a la M. en MRN. Susan Yaracet Paéz León, la Dra. Gloria Sarahi Castañeda Ramírez, el IAT. Jaime Adriel Gómez Gutiérrez y la M. en C. Patricia Vargas Urióstegui quienes me apoyaron en diversas actividades de este proyecto, gracias por su tiempo y dedicación.

Al Dr. Edgar Martínez Fernández por desempeñar como presidente del comité evaluador. Gracias por compartir sus valiosos conocimientos sobre los hongos y sus estructuras, por ayudarme a recordar el maravilloso grupo de los ascomicetos y por las charlas sobre *Daldinia*.

Al Dr. Alejandro García Flores y al Dr. Guadalupe Peña Chora quienes fungieron como revisores de tesis. Gracias por sus valiosos comentarios y aportaciones.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, por su gran amor e infinita misericordia, por sostenerme a cada momento e impulsarme a seguir adelante. Gracias por la sabiduría me has dado Dios, por enseñarme que el principio de ella viene del temor a ti. Gracias por rodearme de gente buena y enseñarme que en el mundo podemos tener muchas aflicciones, pero debemos confiar en ti. No estuviera aquí si no fuera por ti y hoy puedo decir Eben-ezer hasta aquí nos ayudó Jehová.

A mi esposo Jehu, muchas gracias amor mío por el amor, la paciencia y el sostén que me has brindado. Gracias por apoyarme en cada decisión que he tomado, por ser mi respaldo en todo momento, por no permitir que me hiciera la mártir en la vida y enseñarme que tenemos que ser valientes y fuertes para salir adelante. Gracias gauchis ¡Te amo!

A mis padres Emilio y Elia, gracias por siempre mostrarme su amor, por brindarme su auxilio en todo momento, por impulsarme a seguir adelante. Le doy gracias a Dios por tenerlos y porque han estado presentes en cada momento de mi vida.

A mi abuelita Reyna que es una madre para mí. Gracias por todas sus enseñanzas gran parte de lo que soy es por ella. Gracias por llenarme de bendiciones y consejos.

A mis hermanos Evelia, Alejandra e Isai gracias por todo su cariño, cada llamada, mensajes y momentos compartidos que me motivaron a seguir adelante. ¡Los amo!

A mis pastores y hermanos en Cristo gracias por sus oraciones, consejos y palabras de aliento.

A mis compañeros de laboratorio Reyes, Diana, Alma y Martha. Gracias por su compañía, apoyo y todos los momentos que pasamos juntos tanto de angustia como de alegría. ¡Gracias chicos!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.....	iii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.....	7
2.1 La piel.....	7
2.1.1 Las heridas	8
2.1.2 La cicatrización.....	9
2.2 Medicina tradicional	10
2.2.1 Plantas	10
2.2.2 Hongos.....	11
2.3 Género <i>Daldinia</i>	12
2.3.1 <i>Daldinia eschscholtzii</i>	13
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	14
CAPÍTULO IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
CAPÍTULO V. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos particulares.....	14
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Cepa y medio de cultivo.....	15
6.2 Identificación de <i>Daldinia</i> sp.	16
6.3 Velocidad de crecimiento	16
6.3.1 Velocidad de crecimiento con sustratos al 100 %.....	16
6.3.2 Velocidad de crecimiento con mezclas.....	17
6.4 Caracterización del cultivo sólido.....	17
6.5 Elaboración de los extractos	18

6.6 Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios.....	19
6.7 Elaboración del ungüento.....	19
6.8 Toxicidad <i>in vitro</i>	20
6.9 Pruebas de cicatrización <i>in vivo</i>	20
6.10 Espectrofotometría de gases masa (GC/MS).....	21
6.11 Análisis estadístico.....	21
CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 Identificación de <i>Daldinia</i> sp.	22
7.2 Velocidad de crecimiento	23
7.2.1 Velocidad de crecimiento con sustratos al 100 %.....	23
7.1.2 Velocidad de crecimiento con mezclas.....	24
7.3 Caracterización del cultivo sólido.....	26
7.4 Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios.....	28
7.5 Pruebas de toxicidad.....	29
7.6 Pruebas de cicatrización <i>in vivo</i>	31
7.6.1 Evaluación macroscópica de los órganos.....	33
7.7 Espectrofotometría de gases masa (GC/MS).....	34
CAPÍTULO XIII. CONCLUSIÓN	36
CAPÍTULO IX. PERSPECTIVAS	37
CAPÍTULO X. LITERATURA CITADA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la piel	8
Figura 2. Fases del proceso de cicatrización.....	9
Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	15
Figura 4. Micelio de <i>D. eschscholtzii</i> en sustratos al 100 %.....	23
Figura 5. Velocidad de crecimiento de <i>D. eschscholtzii</i> en sustratos al 100 %.....	23
Figura 6. A) Agregaciones de micelio en S1, B) Agregaciones de micelio en S4.....	24
Figura 7. Micelio de <i>D. eschscholtzii</i> en mezclas.....	25
Figura 8. Velocidad de crecimiento de <i>D. eschscholtzii</i> en mezclas	25
Figura 9. Agregaciones de micelio de la M1	26
Figura 10. Inóculo del C1.....	27
Figura 11. Incubación del C1	27
Figura 12. Inóculo del C2.....	27
Figura 13. Incubación del C2	27
Figura 14. Estroma de C1.....	28
Figura 15. Estroma de C2.....	28
Figura 16. Toxicidad de PolC1.....	29
Figura 17. Toxicidad de PolC2.....	29
Figura 18. Toxicidad de ExtC1	30
Figura 19. Toxicidad de ExtC2	30
Figura 20. Porcentaje de contracción.....	32
Figura 21. Contracción de las heridas	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de la secuencia de nucleótidos.....	22
Tabla 2. Características morfológicas del micelio de <i>D. eschscholtzii</i> en sustratos 100 %..	24
Tabla 3. Características morfológicas de micelio de <i>D. eschscholtzii</i> en mezclas	25
Tabla 4. Peso de estromas, CC, EB, TP del C1 y C2.....	28
Tabla 5. Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios.....	29
Tabla 6. Órganos extraídos.....	34
Tabla 7. Compuestos de GC/MS.....	35

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

Abreviatura	Significado
°C	grados centígrados
%	porcentaje
% p/p	porcentaje peso/peso
% v/v	porcentaje volumen/volumen
μL	microlitros
μM	micromolar
AgNP	nanopartículas de plata
BU	base ungüento
C1	cultivo de rastrojo de maíz
C2	cultivo de la mezcla 60/20/20
CC	ciclo de cultivo
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
cm	centímetros
cm ²	centímetros cuadrados
DNA	ácido desoxirribonucleico
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
EB	eficiencia biológica
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Ext	extracto
ExtC1	extracto del estroma del cultivo de maíz
ExtC2	extracto del estroma del cultivo de la mezcla
g	gramos
GC/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas
h	hora
HEMIM	Herbario Micológico de Morelos
IBT	Instituto de Biotecnología

ITS	región espaciadora interna transcrita
kg	kilogramos
lb	libra
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mm ²	milímetros cuadrados
mm/h	milímetros por hora
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pa	Pascales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
Pol	polvo
PolC1	polvo del estroma cultivado en rastrojo de maíz
PolC2	polvo del estroma cultivado en mezcla 60/20/20
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
TP	tasa de producción
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UExtC1	ungüento de extracto de rastrojo de maíz
UExtC2	ungüento del extracto de la mezcla
Ul	ULCODERMA®
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPolC1	ungüento de polvo de hongo de rastrojo de maíz
UPolC2	ungüento de polvo de hongo de la mezcla
UUSMB	Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática

VC

velocidad de crecimiento

VIH

virus de la inmunodeficiencia adquirida

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto fue evaluar ungüentos de *Dalmanella eschscholtzii* (Ehrenb.) Rehm. en la cicatrización de un modelo *in vivo*. Se realizó la identificación molecular de la cepa HEMIM-90. Se evaluó la velocidad de crecimiento (VC) de *D. eschscholtzii* en sustratos al 100 %: S1) rastrojo de maíz, S2) hoja de aguacate, S3) rastrojo de jitomate, S4) aserrín de encino y además en mezclas de rastrojo de maíz, de jitomate y hoja de aguacate en proporciones: M1) 40 %/30 %/30 %, M2) 50 %/25 %/25 %, M3) 60 %/20 %/20 % y M4) 70 %/15 %/15 %. Se cultivó *D. eschscholtzii* en rastrojo de maíz con salvado de trigo 90/10 (C1) y en una mezcla de rastrojo de maíz, de jitomate y hoja de aguacate en proporción 60 %/20 %/20 % (C2). Los estromas cosechados de C1 y C2 se deshidrataron y trituraron para obtener polvo (Pol). Se realizaron extractos (Ext) hidroalcohólicos con etanol al 70 % agregando 10 % de polvo proveniente de ambos cultivos (ExtC1 y ExtC2). Los extractos se concentraron en rotaevaporador y se liofilizaron. Posteriormente de PolC1, PolC2, ExtC1 y ExtC2 se realizaron pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios, pruebas de toxicidad con el nematodo *Panagrellus redivivus* y se elaboraron ungüentos (UPolC1, UPolC2, UExtC1 y UExtC2) a una concentración de 75 mg/mL utilizando el cicatrizante comercial ULCODERMA® (Ul) como control positivo y la base del ungüento (BU) como control negativo. Los ungüentos se aplicaron cada 24 h en heridas de ratones *BALB/c* y se midió el largo y ancho de la herida los días 1, 3, 7, 11, 14 y 17. Una vez cicatrizado se sacrificaron los ratones y se evaluaron los órganos macroscópicamente. Por último, se realizó espectrofotometría de gases masa (GC/MS) de las muestras: PolC1, PolC2, ExtC1 y ExtC2.

La cepa se identificó como *D. eschscholtzii* (acceso al banco de genes OP735354). La VC en sustratos al 100 % fue menor en S4 con 0.17 mm/h y S1, S2 y S3 fueron muy parecidos (0.26-0.27 mm/h). La VC en mezclas fue más alta para M1 (0.31 mm/h) y M3 (0.29 mm/h), la más baja se presentó en M2 (0.14 mm/h) y M4 (0.22 mm/h). El C1 obtuvo una EB de 28.34 % y una TP de 0.51, el C2 una EB de 36.26 y una tasa de

producción de 0.77. Las pruebas colorimétricas mostraron metabolitos secundarios como: saponinas, triterpenos, cumarinas y alcaloides. Tanto polvos como extractos presentaron una toxicidad inferior al 20 % por lo que no se consideraron tóxicos. El ExtC1 en el día 1 presentó un mayor porcentaje de contracción (10 %) y el PolC1 en el día 3 (16 %). En la evaluación macroscópica de los órganos de los ratones no se observó alteración o daño. En total se encontraron 26 compuestos por GC/MS.

El hongo *D. eschscholtzii* presentó actividad cicatrizante por lo que pueden explorarse sus propiedades terapéuticas además al no presentar toxicidad se puede utilizar también en el área alimenticia con mayor seguridad.

ABSTRACT

The aim of this project was to evaluate ointments from *Daldivinia eschscholtzii* (Ehrenb.) Rehm. for healing in an *in vivo* model. Molecular identification of the HEMIM-90 strain was performed. The growth rate (VC) of *D. eschscholtzii* was evaluated in 100 % substrates: S1) corn stubble, S2) avocado leaf, S3) tomato stubble, S4) oak sawdust and also in mixtures of corn stubble, tomato and avocado leaf in proportions: M1) 40 %/30 %/30 %, M2) 50 %/25 %/25 %, M3) 60 %/20 %/20 % and M4) 70 %/15% /15 %. *D. eschscholtzii* was cultivated in corn stubble with 90/10 wheat bran (C1) and in a mixture of corn stubble, tomato, and avocado leaf in a 60/20/20 % ratio (C2). Harvested stroma from C1 and C2 were dehydrated and ground to obtain powder (Pol). Hydroalcoholic extracts (Ext) were made with 70 % ethanol adding 10 % of dust from both cultures (ExtC1 and ExtC2). The extracts were concentrated in a rotary evaporator and lyophilized. After PolC1, PolC2, ExtC1 and ExtC2, colorimetric tests for secondary metabolites, toxicity tests with the *Panagrellus redivivus* nematode, and ointments (UPolC1, UPolC2, UExtC1 and UExtC2) were made at 75 mg/mL concentration using the commercial healing ULCODERMA® (Ul) as a positive control and ointment base (BU) as a negative control. The ointments were applied every 24 h to the wounds of BALB/c mice and the length and width of the wound were measured on days 1, 3, 7, 11, 14 and 17. Once healed, the mice were sacrificed and the organs were evaluated macroscopically. Finally, gas mass spectrophotometry (GC/MS) was performed on the samples: PolC1, PolC2, ExtC1 and ExtC2.

The strain was identified as *D. eschscholtzii* (gene bank access OP735354). The VC in 100 % substrates was lower in S4 with 0.17 mm/h and S1, S2 and S3 were very similar (0.26-0.27 mm/h). The VC in mixtures was highest for M1 (0.31 mm/h) and M3 (0.29 mm/h), the lowest was presented in M2 (0.14 mm/h) and M4 (0.22 mm /h). The C1 obtained an EB of 28.34 % and a TP of 0.51, the C2 an EB of 36.26 and a production rate of 0.77. Colorimetric tests showed secondary metabolites such as: saponins, triterpenes, coumarins and alkaloids. Both powders and extracts had a toxicity of less than 20 %, so they were not considered toxic. The ExtC1 on day 1 presented a higher percentage of

contraction (10 %) and the PolC1 on day 3 (16 %). In the macroscopic evaluation of the organs of the mice, no lesions or damage were observed. In total, 26 compounds were found by GC/MS.

The *D. eschscholtzii* fungus presented healing activity, so its therapeutic properties can be explored. Also, since it does not present toxicity, it can also be used in the food area with greater safety.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los humanos, a través de los años han recurrido a la naturaleza para tratar de cubrir sus principales necesidades (Newman & Cragg, 2007), tales como alimento y medicina. La medicina natural se basa en siglos de sapiencias recopiladas por las culturas antiguas y ha contribuido a las epistemologías de la medicina convencional (Guano, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de la medicina tradicional desde 1975. En nuestro país la mayoría de la población rural utiliza productos naturales para tratar diversos padecimientos, ya que son de fácil acceso, aplicación y manejo, así como de bajo costo. Los recursos naturales que se han utilizado en la medicina son principalmente plantas, aunque también hay reportes de minerales, animales y hongos.

Los hongos son bien conocidos por poseer compuestos biológicos activos en sus cuerpos fructíferos, micelio y caldo de cultivo (Wasser, 2014), debido a esto se le han atribuido propiedades antibióticas, antitumorales, antivirales, inmunoestimulantes, hipolipidémicas (Chowdhury *et al.*, 2015) y cicatrizante (Cheng *et al.*, 2013). Los metabolitos secundarios reportados en hongos con beneficios en la cicatrización han sido principalmente polisacáridos (β -glucanos), compuestos fenólicos (flavonoides), benzopironas (cumarinas), proteínas (lectinas), clorogénicos, cafeicos y ácidos benzoicos (Sharifi-Rad *et al.*, 2020). Algunos hongos con actividad cicatrizante son: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Piptoporus betulinus*, *Schizophyllum commune*, *G. tsugae*, *Agaricus blazei*, *Phellinus gilvus*, *Hericiium erinaceus*, *Sparassis crispa*, *Antrodia camphorata*, *Agaricus bisporus*, *Crinipellis schevczenkovi*, *Daldinia concentrica*, entre muchos otros (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Con respecto al género *Daldinia* se le ha atribuido a *D. concentrica* propiedades analgésica y antibacterial (de Diego Calonge, 2011), además en Chiapas se ha reportado como comestible (Guzmán, 1997) y en diversas tribus de regiones africanas tiene uso medicinal para el tratamiento y cicatrización de heridas (Dutta & Acharya, 2014). Aunque la piel tiene la capacidad de auto-reparación, cuando una herida afecta la dermis, el proceso de cicatrización puede alterar factores que se desencadenan durante la reparación cutánea (Houghton *et al.*, 2005). De acuerdo con el daño provocado en la piel, es

necesario usar tratamientos ya que aceleran el proceso de cicatrización y mantienen un ambiente séptico, es decir, estimulan la reparación celular, el proceso de cicatrización y además eliminar todos los microorganismos patógenos e inactivar los virus para evitar la infección de la herida (Gallardo & Barboza, 2015). Por lo que, en la presente investigación analizaremos el efecto cicatrizante de ungüentos de *D. eschscholtzii* en un modelo murino *in vivo*, con el propósito de probar nuevas opciones terapéuticas naturales que puedan ser en un futuro alternativas para el tratamiento de heridas.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

El órgano más grande del cuerpo humano es la piel y lo protege contra fuerzas mecánicas, radiaciones, microorganismos y otros factores; sin embargo, ésta puede ser afectada por lesiones (heridas) que interrumpen su estructura y función (Guarín-Corredor *et al.*, 2013) produciendo una pérdida de su integridad o una solución de continuidad en los tejidos (Pancorbo-Hidalgo, 2016).

2.1 La piel

La piel es una membrana fibroelástica, considerada la “envoltura viva del cuerpo”, desempeña una gran gama de funciones que incluyen: la protección frente a agresiones externas, la termorregulación, la absorción de radiaciones ultravioleta y la producción de vitamina D. Además, es una eficaz barrera de protección contra microorganismos patógenos, siendo el órgano de mayor extensión y un potente receptor de estímulos sensoriales (Baum & Arpey, 2005). La piel está formada por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1).

La epidermis es la capa más externa y está constituida por varias capas de células llamadas queratinocitos, dispuestas unas sobre otras constituyendo una barrera impermeable para casi todas las sustancias; es la capa que primero se ve perjudicada cuando hay una exposición excesiva al sol o cuando se producen lesiones leves con pérdida de la continuidad de la piel. La dermis representa la mayor proporción de la piel y es el verdadero soporte de este órgano; está constituida por un complicado sistema de fibras entrelazadas, embebidas de una sustancia denominada sustancia fundamental, y en ella se encuentran pelos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Esta puede ser afectada cuando hay heridas de mayor profundidad, además, por contener en su estructura vasos sanguíneos y linfáticos, se presentan hemorragias y ampollas, así como una mayor sensibilidad debido a la presencia de terminaciones nerviosas. Por ello, cuando se lesiona la dermis aparece el dolor. Por último, la hipodermis es la capa más profunda de la piel también llamada tejido subcutáneo y está formada por gran cantidad de células que contienen grasa, llamadas adipocitos (Esteva, 2006).

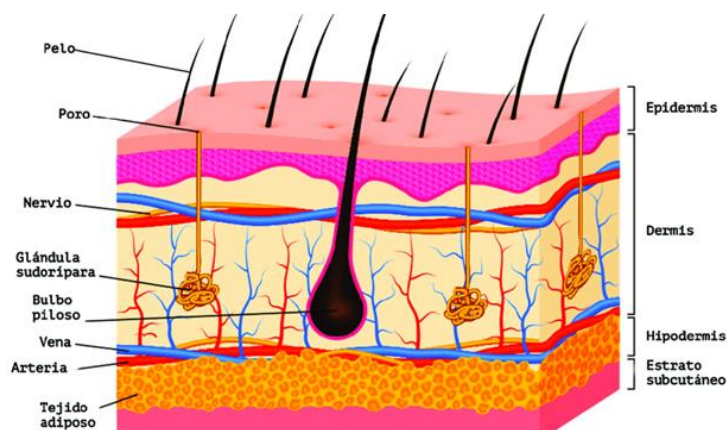


Figura 1. Estructura de la piel. Tomado de: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Anatomia-de-la-piel-Se-pueden-apreciar-sus-diferentes-capas_fig7_340261881

2.1.1 Las heridas

En nuestra vida diaria la piel puede ser afectada y sufrir de heridas o lesiones, que si son leves pueden tratarse en casa. Las heridas se pueden clasificar en función del tiempo como heridas agudas presentando corto tiempo de evolución y en heridas crónicas cuando persisten durante un período prolongado. Las heridas agudas se caracterizan por la curación completa en menos de 30 días y por no presentar complicaciones, siguiendo un proceso de reparación ordenado (Jiménez, 2008). Las heridas agudas pueden ser cortantes, contusas, punzantes, raspaduras, avulsivas, magulladuras, por aplastamientos y quemaduras (Esteva, 2006).

La cicatrización normal de heridas se lleva a cabo en cuatro fases (coagulación, inflamación, proliferación y maduración), sin embargo, existen factores como la oxigenación, infección, suficiencia venosa, edad, género, hormonas sexuales, estrés, isquemia, enfermedades, obesidad, medicamentos, alcoholismo, tabaquismo, condiciones inmunocomprometidas y nutrición que provocan una cicatrización inadecuada (Guo & DiPietro, 2010). Aunque nuestra piel tiene la capacidad de cicatrizar es necesario usar tratamientos pues aceleran el proceso de cicatrización y mantienen un ambiente séptico (Gallardo & Barboza, 2015).

2.1.2 La cicatrización

La cicatrización es un proceso activado a partir del daño producido; se describe por lo general, como una sucesión de eventos independientes. Consta de cuatro fases solapadas e interconectadas que permite el restablecimiento de las características físicas, mecánicas y eléctricas que favorecen las condiciones normales del tejido (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). En la figura 2 se muestran las cuatro fases de este proceso: 1) La fase de coagulación inicia inmediatamente después de presentarse la lesión, su objeto principal es evitar la pérdida de fluido mediante la formación de un coágulo, protegiendo el sistema vascular y la función de los órganos vitales (Velnar *et al.*, 2009); 2) la fase inflamatoria o exudativa es cuando la hemorragia se detiene por medio de las plaquetas y de la formación de fibrina. Aparecen los primeros signos de defensa del organismo (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) con el objetivo de evitar la contaminación de microorganismos; 3) en la fase proliferativa predomina la proliferación celular (fibroblastos y colágeno) con el objetivo de que se vuelvan a formar los vasos destruidos y se rellene la zona defectuosa mediante tejidos de granulación y 4) en la fase de maduración o remodelación se produce una contracción de la herida mediante la transformación del tejido granular en tejido cicatricial. La epitelización cierra el proceso de cicatrización (Esteva, 2006).



Figura 2. Fases del proceso de cicatrización. Tomado de: <https://www.douglaslabs.es/blog/terapia-enzimatica-sistemica-en-el-proceso-de-cicatrizacion/>

En las últimas décadas los productos de origen natural, han logrado alcanzar una apariencia cada vez mayor en la medicina convencional, esto en parte por regresar a lo natural, pero también debido a los efectos desfavorables de los fármacos sintéticos (reproductivos, fallo renal, muerte, resistencia y desórdenes endocrinos en varios grupos terapéuticos) (Moreno-Ortiz *et al.*, 2013), al mejor entendimiento tanto químico,

farmacológico y clínico de las drogas vegetales, al incremento de métodos analíticos que favorecen el control de calidad y al progreso de nuevas formas de preparación y administración de los medicamentos fitoterapéuticos (Castro, 2006).

2.2 Medicina tradicional

En América Latina y en especial en México, la medicina tradicional es un fenómeno vigente de la cultura nacional (Nigenda *et al.*, 2001). La organización mundial de la salud la define como “*La suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas tanto en el mantener de la salud como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales*”. La medicina tradicional ha ejercido un rol importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo (Prieto-González *et al.*, 2004), algunos de estos padecimientos han sido lesiones de la piel, infecciones cutáneas, traumatismos, dolor muscular o reumático y picaduras de animal, fiebre, dolor de cabeza y articulaciones en general (Zolla, 2007). Por cientos de años las plantas han sido la base de los sistemas de la medicina tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre (Newman & Cragg, 2007).

2.2.1 Plantas

Desde tiempos históricos está establecido que el hombre utiliza las plantas con fines medicinales (De Pasquale, 1984): Santamaría (2014) efectuó un estudio sobre la comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris*) y aguacate (*Persea americana*) en heridas de 2 cm² con una profundidad de 3 mm en ratones (*Mus musculus*), se evaluaron 6 tratamientos: sin tratamiento, con eterol (control), malva 100 %, aguacate 100 %, malva/ aguacate en proporción de 65/35 y 35/65). El extracto a una proporción de 65:35 cicatrizó completamente la herida en el día 7, esto debido a la presencia de flavonoides y taninos en la malva y los taninos en el aguacate, que al combinarse presentaron sinergia lo que favoreció la cicatrización además de que tuvo similitud con el grupo control que tardó ocho días en cicatrizar, cabe mencionar que no presentó efectos adversos.

También, se evaluó la actividad cicatrizante del extracto de las hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en tensión inducida en ratones (*M. musculus*) realizando una extracción sucesiva de éter, etanol y agua. Los tratamientos evaluados se aplicaron por vía tópica y fueron los siguientes: sin tratamiento, crema base (acetato de prednisolona 0.5 g y sulfato de neomicina 0.5 g), alcohol al 40 % y extracto a concentraciones de 25 %, 50 % y 75 %. El extracto que tuvo resultados más eficaces fue el de 75 %, ya que el tiempo de cicatrización fue de 7 días a diferencia de los demás tratamientos y no presentó reacciones adversas a nivel cutáneo. En la cuantificación de metabolitos secundarios, se determinó contenidos significativos de flavonoides totales equivalentes a quercetina y fenoles totales (Guano, 2015).

2.2.2 Hongos

Con respecto a hongos, en dos comunidades tseltales de Oxchuc, Chiapas, México utilizan el polvo del hongo (esporas) *Scleroderma verrucosum* y *S. aerolatum* sobre las heridas (humanos) y el sangrado disminuye (Robles *et al.*, 2007). Además, en Pixoy Valladolid han utilizado especies de *Geastrum* como desecante que acelera la cicatrización del ombligo de los niños (Mata, 1987). Otro hongo utilizado con el mismo fin es *Leotia lubrica*, cuyo apotecio es asado y colocado sobre el ombligo de los recién nacidos (Robles *et al.*, 2007). Asimismo, se ha estudiado el efecto del hongo medicinal *Sparassis crispa* sobre heridas en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, donde el cierre de la herida se aceleró significativamente con la administración oral de *S. crispa*, además, hubo aumento significativo en la migración de macrófagos y fibroblastos, regeneración de colágeno y epitelización en comparación con el grupo de control (Kwon *et al.*, 2009). En otro estudio se utilizó un extracto crudo de *Agaricus sylvaticus* en heridas de ratas Wistar, el tratamiento fue 1 mL de gel al 10 % de *A. sylvaticus* durante 14 días. Los fenoles promovieron el proceso de curación (cicatrización mejorada) (Da Silva *et al.*, 2018). Montalbano (2018) realizó un extracto de *G. lucidum* que contenía etanol al 5 % v/v, metanol absoluto y agua desionizada, el extracto promovió la cicatrización de heridas, debido a los triterpenos primarios y secundarios además mejoró la proliferación y la migración de queratinocitos, sin efectos morfológicos citotóxicos o aberrantes.

2.3 Género *Daldinia*

Con respecto al género *Daldinia* hay estudios realizados en dos comunidades de la Selva Lacandona, Chiapas, México donde se reportó que los lacandones perciben a *D. concentrica* (*k'ip sup*) junto con otras especies con un uso de “servicio ecosistémico” ya que, degradan la materia orgánica del suelo, restableciéndole sus niveles de nutrimentos y volviéndolo en consecuencia más fértil (Ruan-Soto *et al.*, 2007), además se le atribuye propiedad analgésica, sedante y es usado para el tratamiento de calambres musculares (de Diego Calonge, 2011). En China se está estudiando sus propiedades retrovirales para el VIH (Qin *et al.*, 2006). También se realizó un estudio donde se evaluó la actividad antibacterial de un extracto acuoso, etanólico y clorofórmico de cuerpos fructíferos de *D. concentrica* contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, los resultados mostraron la capacidad antibacterial del extracto etanólico y clorofórmico contra *S. aureus* principalmente (Segun *et al.*, 2011). Dutta & Acharya (2014) realizaron un estudio en West Bengal, India y reportaron que *D. concentrica* es utilizado para aliviar la picazón, ardor e infecciones menores en la piel, los cuerpos fructíferos son mezclados con aceite de coco y aplicados directamente sobre la piel. Rajeshwaran *et al.* (2017) evaluaron el efecto cicatrizante de *D. concentrica* sobre un modelo *in vivo* de ratas Wistar comparado un antibiótico estándar utilizado en la cicatrización de heridas (Neosporin) y reportaron un excelente efecto de cicatrización (75-87 %), posteriormente, se realizó un análisis químico del extracto donde encontraron alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, terpenoides y saponinas en el extracto.

En algunos lugares de los Altos Chiapas *D. concentrica* es considerada comestible (Guzmán, 1997), los informantes de la comunidad Pak'blina de Oxchuc, Chiapas lo consumen asado y, además, comentan que es muy apetecible (Robles *et al.*, 2007); otra especie con el mismo fin es *D. fissa*, la cual se vende en mercados públicos de Guatemala y se come asada con sal y limón (Morales *et al.*, 2006) aunque, los especímenes de coloración oscura y consistencia carbonosa, se consideran poco apetecibles.

A nivel mundial el género *Daldinia* presenta 48 especies (Stadler *et al.*, 2014) de las cuales están reportadas 18 para México (Barbosa-Reséndiz *et al.*, 2020). Las especies de este género se caracterizan por tener un estroma zonado horizontalmente en su interior (Stadler *et al.*, 2014) de hasta 3 cm de diámetro, carbonoso, de color negro, globoso o subgloboso con peritecios justo debajo de la corteza estos pueden ser ostiolados globosos a elipsoidales u obpiriformes. Las ascas son unitunicadas y cilíndricas; las ascosporas unicelulares, de color marrón oscuro, uniseriadas, elípticas-fusififormes, con hendidura germinal (Dennis, 1968; Halin, 1990). Las especies de este género son lignícolas y saprofitas, habitan en bosques tropicales y subtropicales y rara vez en los templados o fríos. Se ha encontrado más abundancia de especies e individuos en regiones tropicales, sobre todo en las de tipo secundario o de perturbación (Pérez-Silva, 1973).

2.3.1 *Daldinia eschscholtzii*

Daldinia eschscholtzii es una especie gregaria, presenta estromas sésiles a subestipitados de aproximadamente 10-70 × 10-65 mm, superficie lisa en tonalidades marrón vináceo, sepia grisáceo o vino grisáceo en etapa joven y marrón oscuro a negro en la maduración (Barbosa-Reséndiz *et al.*, 2020). Se ha encontrado en bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo creciendo en madera en descomposición de leguminosas. En México se ha reportado su distribución en Veracruz (Child, 1932), Campeche, Oaxaca, Quintana Roo, Tamaulipas (Ju *et al.*, 1997), Chiapas, Jalisco, Nayarit (Stadler *et al.*, 2014) y Barbosa-Reséndiz *et al.* (2020) reportaron nuevo registro en los estados de Colima, Estado de México, Guerrero, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Yucatán y Zacatecas. *D. eschscholtzii* y también *D. concentrica* se ha empleado para algunas enfermedades o problemas de salud como el dolor de espalda, resfriados, granos y flema (Guzmán, 2008). Zhang *et al.* (2011) reportaron que *D. eschscholtzii* produce inmunosupresores conocidos como dalesconoles A y B; además se han hecho estudios con respecto a inhibición de división celular, ensayos clínicos con células cancerígenas y como antioxidante debido a sus metabolitos Daldinial A, Daldinil C y citocalasinas (Osmanova *et al.*, 2010; Stadler, 2014).

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Existen diversos factores que afectan el proceso normal de cicatrización en las heridas tales como: edad, alimentación, enfermedades, medicamentos, exceso de exudado, deshidratación de la herida, entre otros. Aunque hay diversos productos naturales que ayudan a mejorar la cicatrización la mayoría se obtiene de los recursos naturales silvestres. Con respecto a los antecedentes de hongos, *D. concentrica* presenta actividad cicatrizante, por lo que se analizará el efecto cicatrizante del hongo cultivado *D. eschscholtzii* mediante la aplicación de ungüentos a ratones, esperando que los ungüentos mejoren el proceso de cicatrización.

CAPÍTULO IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentarán actividad cicatrizante los ungüentos de *D. eschscholtzii* en heridas inducidas en ratones BALB/c?

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar ungüentos de *D. eschscholtzii* en la cicatrización de un modelo *in vivo*.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar el cultivo sólido de *D. eschscholtzii*.
- Identificación molecular de la cepa de *Daldinia* sp.
- Evaluar la toxicidad *in vitro* con *P. redivivus*.
- Elaborar ungüentos a partir del polvo y extracto de *D. eschscholtzii*.
- Evaluar el efecto cicatrizante de *D. eschscholtzii* en un modelo *in vivo* en ratones BALB/c.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 3 se muestra la representación gráfica del proceso metodológico.

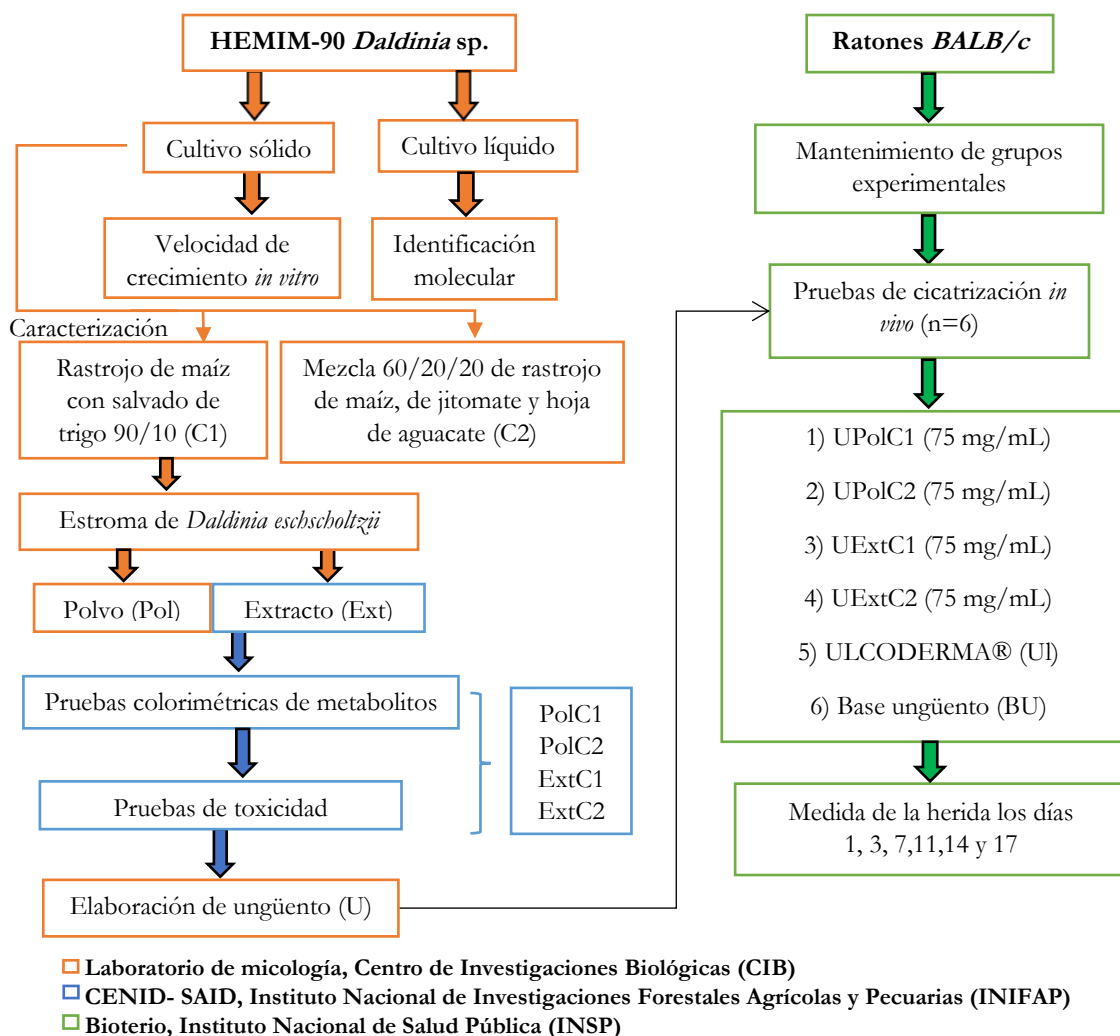


Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

6.1 Cepa y medio de cultivo

Se utilizó la cepa HEMIM-90 correspondiente a *Daldinia* sp. obtenida del Cepario HEMIM del Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas. La cepa se creció en medio sólido Agar Papa Dextrosa (PDA) y se mantuvo en incubación a 25 °C en oscuridad durante 7 días. Para la identificación molecular se inoculó la cepa en un medio líquido que contenía glucosa (C₆H₁₂O₆), sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁), extracto de levadura y harina de arroz.

6.2 Identificación de *Daldinia* sp.

La cepa de *Daldinia* sp. se creció en medio líquido durante siete días. Posteriormente la biomasa se separó del caldo de cultivo, se secó con papel secante estéril y se colocó en tubos de microcentrífuga de 1 mL. La muestra se envió a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca, Morelos.

En la UUSMB realizaron la extracción de DNA genómico utilizando Quick-DNA Fungal/Bacterial. La amplificación de las secuencias ITS1 e ITS2 se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGTCTATTGATATGC). La mezcla de reacción contenía: 25 μ L de Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, 5 μ L Oligo ITS1 (5 μ M) y Oligo ITS4 (5 μ M), 2 μ L de DNA (5 ng/ μ L) y 13 μ L de agua, el programa del termociclador (Bio Rad T100) fue el siguiente: 98 °C/3 min y 98 °C/30 seg por 1 ciclo, 55 °C/ 30 seg y 72 °C/30 seg por 30 ciclos, 72 °C/5 min, y por último se mantuvo a 10 °C. La amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1.5 % con buffer TAE. El producto de la reacción se purificó utilizando un volumen de AMPure XP Beads, siguiendo a detalle las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) y European Molecular Biology Laboratories (EMBL).

6.3 Velocidad de crecimiento

6.3.1 Velocidad de crecimiento con sustratos al 100 %

La velocidad de crecimiento (VC) se evaluó en cuatro sustratos (S): S1) rastrojo de maíz, S2) hoja de aguacate, S3) rastrojo de jitomate y S4) aserrín de encino (6 repeticiones). Los sustratos se trituraron (1 cm aproximadamente) e hidrataron durante 30 min con agua caliente, subsecuentemente se colocaron en cajas Petri de vidrio de 90 mm y se esterilizaron en olla de presión a 121 °C/15 lb de presión por 2 h. El sustrato se inoculó un día después con un disco de micelio de 5 mm de diámetro y se incubó a 25 °C, el

aumento del micelio se midió con una regla cada 24 h en los cuatro lados de la caja (0°, 90°, 180° y 360°) hasta que el micelio colonizó toda la superficie del sustrato (Modificado de Martínez *et al.*, 2015).

6.3.2 Velocidad de crecimiento con mezclas

Con respecto a los resultados obtenidos en el experimento precedente, se eligieron los tres sustratos con mayor VC para realizar mezclas (M). Los sustratos fueron rastrojo de maíz, rastrojo de jitomate y hoja de aguacate, los cuales se utilizaron en las siguientes proporciones: M1) 40 %/30 %/30 %, M2) 50 %/25 %/25 %, M3) 60 %/20 %/20 % y M4) 70 %/15 %/15 % bajo los criterios de Gaitán-Hernández *et al.* (2006). El proceso se realizó con el mismo procedimiento que el experimento anterior. De ambos experimentos se tomaron las características morfológicas del micelio: textura, tipo de micelio, densidad y color que presenta a lo largo de su crecimiento (Sobal *et al.*, 2007).

6.4 Caracterización del cultivo sólido

Se preparó inóculo con semilla de trigo, la cual se limpió e hidrató durante 20 min, por cada kg de peso seco de trigo se le agregó 5 g de cal y 20 g de yeso. La semilla se colocó en frascos de vidrio y se esterilizó a 121 °C durante 90 min. Subsecuentemente se inoculó con la cepa e incubó a 25 °C (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

La siembra se realizó en (C1) rastrojo de maíz (90/10 salvado de trigo) y en una (C2) mezcla de rastrojo de maíz, de jitomate y hoja de aguacate en proporción 60/20/20 elegida con respecto a los resultados obtenidos en el experimento de VC con mezcla. Los sustratos se secaron previamente y trituraron (3 cm aproximadamente), después se realizó la mezcla y se hidrató durante 30 min. Se colocaron 600 g de sustrato previamente drenado, en bolsas de polipropileno con filtro y se esterilizó a 121 °C durante 2 h. Posteriormente, se inoculó e incubó a temperatura ambiente hasta que el micelio cubrió el sustrato. Al presentar los primordios las bolsas fueron retiradas con mucho cuidado para evitar daños en el sustrato y micelio. Una vez que emergieron los estromas (cuerpos fructíferos) fueron cosechados (Acosta-Urdapilleta, 2000; Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010).

Durante la fase de fructificación se tomaron parámetros como: eficiencia biológica (EB %), tasa de producción (TP), ciclo de cultivo (CC días) y diámetro de carpóforos (cm). Cabe mencionar que también se controló la humedad, temperatura, aireación, iluminación y plagas (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

La eficiencia biológica se calculó con la siguiente fórmula (Tschierpe & Hartmann, 1977):

$$EB = \frac{\text{Peso fresco de los hongos cosechados}}{\text{Peso seco del sustrato empleado}} \times 100 \quad (1)$$

De acuerdo con lo propuesto por Royse en 1989 se determinó la tasa de producción con la siguiente fórmula:

$$TP = \frac{EB \%}{CC} \quad (2)$$

El ciclo de cultivo (CC) se calculó con el período de colonización del sustrato más el período de fructificación en días (Acosta-Urdapilleta, 2000). Los estromas obtenidos se colocaron en un gabinete de secado donde se deshidrataron por flujo de aire (de la Torre *et al.*, 2003) una vez secos se trituraron en una licuadora para obtener polvo (Pol) y se guardó en recipientes herméticos para protección de humedad y luz.

6.5 Elaboración de los extractos

Se elaboraron extractos (Ext) hidroalcohólicos con etanol al 70 %, agregando 10 % de polvo de hongo, del cultivo de rastrojo de maíz (ExtC1) y del cultivo de la mezcla 60/20/20 (ExtC2). Los extractos se mantuvieron en agitación a 120 rpm/25 °C durante tres días, cada 24 h se filtró con papel Whatman grado 4, tela manta de cielo y filtro de café, el residuo se devolvió al matraz agregando 400 mL de solvente, el sobrenadante se centrifugó (Centurion Scientific Limited) durante 5 min a 3500 rpm y se guardó en refrigeración (modificado de Rajeshwaran *et al.*, 2017). El extracto se concentró en un rotaevaporador (Heidolph modelo Hei-VAP Advantage) a 45 °C a 80 rpm, posteriormente se guardó a -80 °C hasta su liofilización (LABCONO FreeZone 6) al alto vacío a una presión de 28 Pa y a temperatura de -51°C durante 64 h (Pineda-Alegría *et al.*, 2017).

6.6 Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios

Se realizaron pruebas fitoquímicas de colorimetría siguiendo la metodología de Miranda & Cuéllar-Cuéllar (2001). El experimento se hizo por triplicado añadiendo 5 mg de muestra: polvo de hongo del cultivo de maíz (PolC1), polvo de hongo del cultivo de la mezcla (PolC2), extracto de hongo del cultivo de maíz (ExtC1), y extracto de hongo del cultivo de la mezcla (ExtC2), después de 5 min se observaron cambios en la coloración.

Para flavonoides se realizó mediante la reacción Shinoda: 1 mL de metanol, 2 a 3 virutas de Mg y 2-3 gotas de HCl concentrado (coloración rojiza indica positivo). Las saponinas se confirmaron por la formación de espuma en 1 mL de agua. Para los triterpenos se utilizó la reacción de Liebermann-Burchard, 1 mL del reactivo de anhídrido acético, 100 μ L de ácido sulfúrico y 10 gotas de ácido clorhídrico (coloración roja, rosa, púrpura, o azul se considera prueba positiva). Carbohidratos se determinó mediante la prueba de Molisch, 1 mL de agua, 2 gotas de alfa-naftol (1 %) y 7 gotas de ácido sulfúrico (coloración violeta positivo). Cumarinas 1 mL de metanol, 1 mL de hidróxido de sodio alcohólico y 8 gotas de ácido clorhídrico (presencia cuando desaparece el color amarillo de la muestra) y alcaloides a través de la reacción de Wagner, 1 viruta de yodo, yoduro de potasio y 1 mL de agua destilada (positivo color marrón).

6.7 Elaboración del ungüento

El ungüento (U) se elaboró mediante dos fases. La fase acuosa contenía agua destilada, propilenglicol y lauril sulfato de sodio. La fase oleosa contenía vaselina líquida y alcohol estearílico. Ambas fases se colocaron en vasos de precipitado por separado y se calentaron a baño maría hasta fundirse, se retiraron del baño y se añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa en pequeñas porciones agitando hasta enfriamiento. Se usó agitación mecánica mediante un emulsionador regulado a alta velocidad (modificado de Olmos, 2017).

6.8 Toxicidad *in vitro*

Cultivo de *P. redivivus*: La cepa del nematodo de vida libre *P. redivivus* fue donada por el Dr. Ramon de Lara Andrade de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, se cultivó en un medio de avena (200 g) con agua purificada (300 mL) en recipientes de plástico de 15 x 15 x 5 cm, se calentó en un horno de microondas durante 5 min, una vez fría se inocularon los nematodos. Finalmente se cubrió el recipiente con una manta de cielo. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente (25-28 ° C). Se hidrató conforme se evaporaba el agua (de Lara *et al.*, 2007).

Prueba de toxicidad: Los tratamientos evaluados fueron: T1) PolC1, T2) PolC2, T3) ExtC1, T4) ExtC2 en concentraciones 1.25, 2.5, 5, 7.5, y 10 %, T5) agua destilada (control -) y T6) ivermectina comercial 5 mg/mL (control +). En placas ELISA se colocaron 50 µL de *P. redivivus* con aproximadamente 150 larvas juveniles y 50 µL de tratamiento, el experimento fue con 4 repeticiones y tuvo una exposición de 48 h a temperatura ambiente, después se observó en el microscopio estereoscópico 10 alícuotas de 10 µL y se contaron las larvas vivas y muertas (Pineda-Alegrían *et al.*, 2017). El porcentaje de mortalidad se calculó con la siguiente formula: (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2022).

$$(\%) \text{mortalidad de nematodos} = \frac{\text{nematodos muertos}}{\text{nematodos muertos} + \text{nematodos vivos}} \quad (3)$$

6.9 Pruebas de cicatrización *in vivo*

Para las pruebas *in vivo* se emplearon 36 ratones *BALB/c* (18 hembras y 18 machos) de seis semanas de edad con un peso de 19.5 g ± 2.1 provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) Cuernavaca, Morelos. Los ratones fueron manipulados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Se alojaron individualmente en jaulas de polipropileno con camas de viruta esterilizada cubiertas con rejillas metálicas en una habitación a 25 ° C, 55 % de humedad y un ciclo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Con respecto a la comida se mantuvieron con libre acceso al alimento (Lab Diet 5008) y al agua purificada estéril (Fuentes *et al.*, 2008).

Los ratones se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=6). Los grupos evaluados fueron: 1) UPolC1 75 mg/mL, 2) UPolC2 75 mg/mL, 3) UExtC1 75 mg/mL, 4) UExtC2 75 mg/mL, 5) ULCODERMA® control positivo (Ul) y 6) Base ungüento control negativo (BU). Se retiró el pelaje de los ratones de la zona torácica dorsal con crema depilatoria Nair™ para piel sensible y se colocó naproxeno 10 g / lidocaína 2 g durante 5 min. Se realizó una escisión de 100 mm² con punch biopsia y un bisturí (Proaño, 2013). Los tratamientos se aplicaron por vía subcutánea cada 24 h y se midió el largo y ancho de la herida los días 1, 3, 7, 11, 14 y 17 (Rajeshwaran *et al.*, 2017). El área se calculó con la siguiente fórmula donde r1= radio 1, r2= radio 2 (Ambulkar *et al.*, 2020).

$$A = r1 * r2 * \pi \quad (4)$$

El porcentaje de contracción de la herida se calculó con fórmula siguiente:

$$\% \text{ de contracción de la herida} = \frac{A0 - An}{A0} \times 100 \quad (5)$$

donde A0= Área en el día 0 y An=Área en el día que se realizó la medición (Belachew *et al.*, 2020).

Los ratones fueron sacrificados en una cámara de éter ligero consecutivo de una dislocación cervical para examinar macroscópicamente órganos vitales como el corazón, bazo y pulmones con la finalidad de identificar lesiones o anomalías por la aplicación de los tratamientos (Rajeh *et al.*, 2012).

6.10 Espectrofotometría de gases masa (GC/MS)

Este análisis de GC/MS de PolC1, PolC2, ExtC1 y ExtC2 lo realizaron el Dr. Arnoldo Wong Villarreal y el Dr. Emanuel Hernández Núñez en el Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

6.11 Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el paquete estadístico de STATISTICA 7 empleando un ANOVA de una vía seguido de pruebas *post hoc* (Fallas, 2012). Se consideró estadísticamente significativa una p<0.05.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Identificación de *Daldinia* sp.

La secuencia nucleotídica de la región ITS recibida por la UUSMB fue la siguiente:

```
CTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTATCTAAACTCCAACCCTATGTGAACITAC
CGCCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGTTTCGCCCTGTAGTTTACTACCTGGCGGGCGCGCTACAGGCCCGC
CGGTGGACTGCTAAACTCTGTTATATATATACGTATCTCTGAAATGCTTCAACTTAATAAGTTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCITGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGGC
ATGCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGCTTAGCGTTGGGAATCTAGGTCITCA
GGCCTAGTTCCTCCAAAGTCATCGGCGGAGTCGGAGCGTACTCTCAGCGTAGTAATACCATTCTCG
CTTTGTAGTAGCCCCGGCGGCTTGCCGTA AACCCCTATATCTTTAGTGGTTGACCTCGAA
```

La secuencia se depositó en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con el número de acceso OP735354. Al compararse en las bases de datos: plataforma Blast (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y EMBL (https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_ncbiblast/toolform.ebi) se confirmó la especie del hongo como *D. eschscholtzii* del phylum Ascomycota (Hypoxylaceae, Xylariales) con el 100 % de identidad (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la secuencia de nucleótidos

Plataforma	Descripción	No. Acceso al banco de genes	% identidad
NCBI	<i>Daldinia eschscholtzii</i> cepa LCM 970.01 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña.	MF495455.1	100%
	<i>Daldinia eschscholtzii</i> INBio:163A gen de ARN ribosomal 18S.	KU204523.1	99.81%
	<i>Daldinia eschscholtzii</i> aislado 31i gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña	MZ270647.1	99.81%
EMBL	<i>Daldinia eschscholtzii</i> cepa LCM 970.01 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña.	EM_FUN:MF495 455	100%
	<i>Daldinia eschscholtzii</i> aislado 31i gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña	EM_FUN:MZ270 647	99.8%
	<i>Daldinia eschscholtzii</i> INBio:163A gen de ARN ribosomal 18S	EM_FUN: KU204523	99.8%

7.2 Velocidad de crecimiento

7.2.1 Velocidad de crecimiento con sustratos al 100 %

Los sustratos evaluados fueron rastrojo de maíz (S1), hoja de aguacate (S2), rastrojo de jitomate (S3) y aserrín de encino (S4), el crecimiento del micelio se observa en la figura 4. La VC más baja se presentó en S4 y los cuatro sustratos restantes fueron similares (Figura 5). Se ha reportado VC lineal para *D. concentrica* entre 0.30 y 0.38 mm / h en medio PDA (Boddy *et al.*, 1985). En rastrojo de maíz y viruta de encino se ha reportado una VC radial de 0.31 y 0.18 mm/h respectivamente (Sandoval, 2022). Dichos datos son más elevados a los obtenidos en este experimento a excepción de viruta de encino, el cual, coincide con S4.

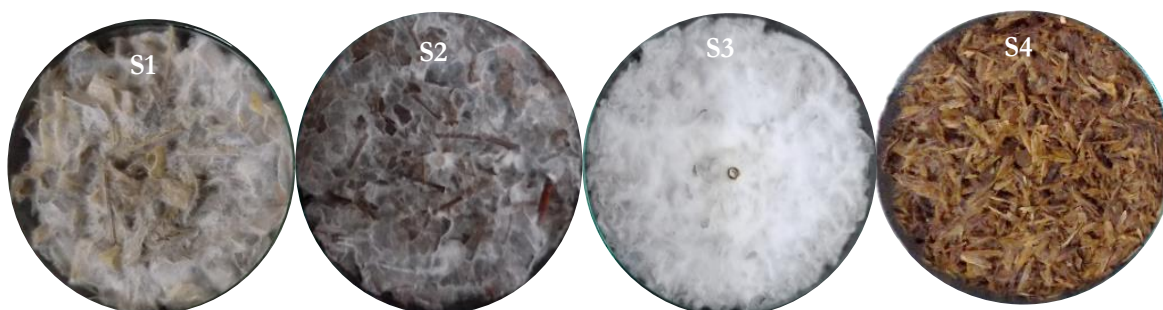


Figura 4. Micelio de *D. eschscholtzii* en sustratos al 100 %

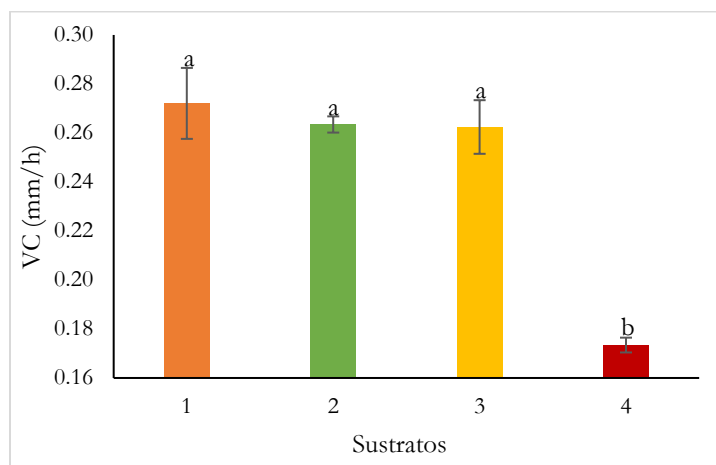


Figura 5. Velocidad de crecimiento de *D. eschscholtzii* en sustratos al 100 %. Las líneas de dispersión indican el intervalo de confianza del 95 %. Promedios con letras diferentes indican que difieren significativamente (Tukey, $p < 0.05$).

En la tabla 2 se muestran las características morfológicas que presentó el micelio de *D. eschscholtzii* en los cuatro sustratos al 100 %. El S1 y S3 presentaron las mismas características y el S4 fue el sustrato con menor crecimiento de micelio. A los 19 días se presentaron agregaciones de micelio en S1 (Figura 6.A) y a los 11 días el S4 mostró micelio denso en la periferia (Figura 6.B).

Tabla 2. Características morfológicas del micelio de *D. eschscholtzii* en sustratos 100 %

Características	S1	S2	S3	S4
Textura	Algodonosa	Aterciopelada	Algodonosa	Aterciopelada
Tipo de micelio	Aéreo	Rastrero	Aéreo	Rastrero
Densidad	Abundante	Regular	Abundante	Escaso
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Hialino
Humedad (%)	79.79	81.64	66.94	67.81

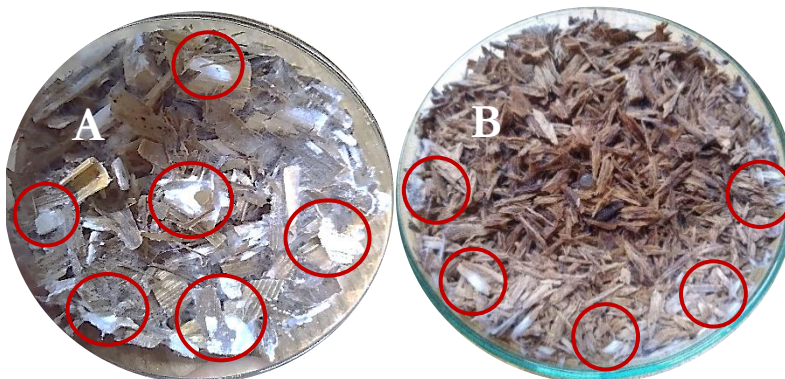


Figura 6. A) Agregaciones de micelio en S1, B) Agregaciones de micelio en S4

7.1.2 Velocidad de crecimiento con mezclas

Con respecto a los resultados anteriores se eligieron los siguientes sustratos: rastrojo de maíz, rastrojo de jitomate y hoja de aguacate en proporciones 40 %/30 %/30 % (M1), 50 %/25 %/25 % (M2), 60 %/20 %/20 % (M3) y 70 %/15 %/15 % (M4) respectivamente (Figura 7). Las mezclas que presentaron VC más alta fueron la M1 y M3 mientras que la M4 y M2 los más bajos (Figura 8). Cabe destacar que en ocasiones la mezcla de sustratos en distintas cantidades ayuda a incrementar obtención de hongos (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006). En la tabla 3, se muestran las características morfológicas

de las cuatro mezclas evaluadas, la M1 presentó a los 18 días agregaciones de micelio (Figura 9).

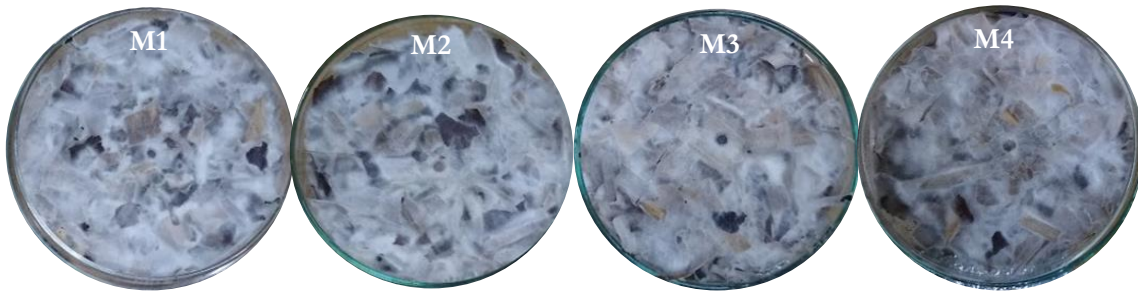


Figura 7. Micelio de *D. eschscholtzii* en mezclas

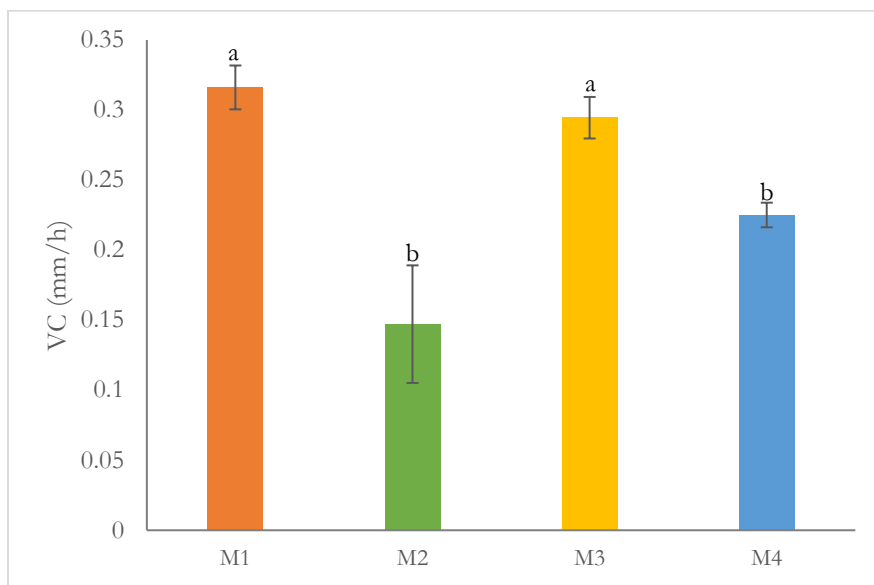


Figura 8. Velocidad de crecimiento de *D. eschscholtzii* en mezclas. Las líneas de dispersión indican el intervalo de confianza del 95 %. Promedios con letras diferentes indican que difieren significativamente (Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 3. Características morfológicas de micelio de *D. eschscholtzii* en mezclas

Características	M1	M2	M3	M4
Textura	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa
Tipo de micelio	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo
Densidad	Abundante	Abundante	Abundante	Abundante
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Humedad (%)	69.42	69.88	84.53	70.77



Figura 9. Agregaciones de micelio de la M1

7.3 Caracterización del cultivo sólido

Los sustratos se seleccionaron con base a la disponibilidad y abundancia en la región, al precio de adquisición y facilidad para transportar (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006). Con respecto a los resultados obtenidos en VC se eligió la M3 para la caracterización del cultivo sólido, debido a que hay más abundancia de rastrojo de maíz en el estado de Morelos, ya que la mezcla contiene el 60 % de este sustrato. Se cultivó *D. eschscholtzii* en rastrojo de maíz 90/10 salvado de trigo (C1) y en una mezcla de rastrojo de maíz, de jitomate y hoja de aguacate en proporción 60 %/20 %/20 % (C2).

En el C1 el grano de trigo colonizó en 7 días, al inicio se presentó una coloración grisácea, una vez que el micelio invadió los granos de trigo se tornó verdoso (Figura 10) y el periodo de incubación (Figura 11) fue de 24 días. En el C2 el trigo fue invadido por completo entre 6-8 días (Figura 12) y el tiempo de incubación fue de 18 días (Figura 13). Hay reportes donde la semilla invadió en 13 días siendo un tiempo más prolongado al obtenido por Brito (2022). En la India cultivaron a *Pheolus schweinitzii* y *D. concentrica* en paja de arroz y semilla de sorgo, reportando una incubación de 23 días (Subbulakshmi & Kannan, 2016) similar a la del cultivo C1 y elevada para el C2.



Figura 10. Inóculo del C1



Figura 11. Incubación del C1



Figura 12. Inóculo del C2



Figura 13. Incubación del C2

En la tabla 4 se muestran los datos de fructificación del C1 y C2. Se obtuvo un total de 162 g en C1 y 168.33 g en C2 de estromas en fresco (Figura 14 y 15). En C1 se obtuvo una EB de 28.34 % y una TP de 0.51. En C2 una EB de 36.26 % y una TP de 0.77. Brito (2022) realizó dos experimentos sobre el cultivo de *Daldinia* sp. en rastrojo de maíz/encino/salvado de trigo (80/10/10) en el primero se obtuvo una EB de 22.05 % y una TP de 0.62 y en el segundo una EB de 24.73 % y una TP de 0.72. La EB obtenida en C1 es más alta a las reportadas por Brito y la de C2 es cercana. Con respecto a la TP son más elevadas a las del C1 e inferior a las del C2.

Tabla 4. Peso de estromas, CC, EB, TP del C1 y C2

C	Peso (g)	Diámetro del estroma (cm)		Grosor del estroma (cm)		CC	EB (%)	TP
		Min	Max	Min	Max			
C1	32.4±3.05	1.3±0.48	3.2±0.67	0.49±0.04	0.83±0.29	55±0	28.34±2.67	0.51±0.05
C2	33.67±2.53	1.2±0.45	2.3±0.43	0.84±0.36	1.33±0.43	47±0	36.26±2.72	0.77±0.06

C=cultivo, CC= ciclo de cultivo, EB= eficiencia biológica, TP= tasa de producción, Min= mínimo, Max=máximo \bar{x} = 5 repeticiones



Figura 14. Estroma de C1



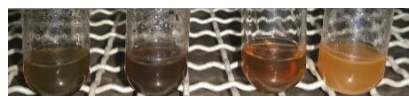





Figura 15. Estroma de C2

7.4 Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios

Las pruebas de colorimetría indicaron presencia de saponinas en todos los tratamientos, sin embargo, los flavonoides y carbohidratos no se presentaron en ningún tratamiento. Los triterpenos tanto en polvo como en extracto mezcla; las cumarinas en el extracto de maíz y alcaloides en polvo mezcla (Tabla 5). Con la misma técnica se evaluó la presencia de metabolitos secundarios de extracto acuoso y etanólico del hongo silvestre *G. lucidum*, el extracto etanólico presentó fenoles, cumarinas, taninos, aminos, antocianinas, aminoácidos, azúcares, catequinas, triterpenos y esteroides y ambos extractos presentaron alcaloides y flavonoides (Aguilar *et al.* 2021). Velásquez & Zaravia (2014) también realizaron un estudio micoquímico de la parte vegetativa y germinativa de *G. lucidum* y encontró triterpenoides, alcaloides, lactonas, aminoácidos libres y azúcares reductores. De estos metabolitos en *D. eschscholtzii* solo encontramos triterpenos, cumarinas y alcaloides. Las pruebas químicas son pruebas cualitativas que nos dan un punto de partida para conocer la presencia de metabolitos secundarios mediante la coloración de las reacciones con la muestra.

Tabla 5. Pruebas colorimétricas de metabolitos secundarios

Prueba	PolC1	PolC2	ExtC1	ExtC2	PolC1	PolC2	ExtC1	ExtC2
Flavonoides	-	-	-	-				
Saponinas	+	+	+	+				
Triterpenos	-	+	-	+				
Carbohidratos	-	-	-	-				
Cumarinas	-	-	+	-				
Alcaloides	-	+	-	-				

(-) Ausencia; (+) leve; (++) Moderado; (+++) Abundante

7.5 Pruebas de toxicidad

La ivermectina presentó una toxicidad de 100 % en los cuatro tratamientos. La toxicidad más alta para PolC1 y PolC2 fue de 5 % a una concentración de 25 mg/mL y la más baja de 1 % a una concentración de 100 mg/mL (Figura 16 y 17).

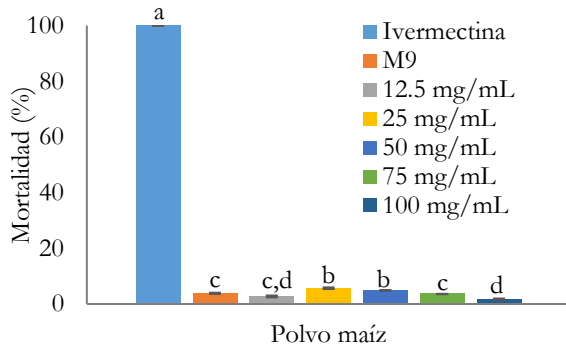


Figura 16. Toxicidad de PolC1

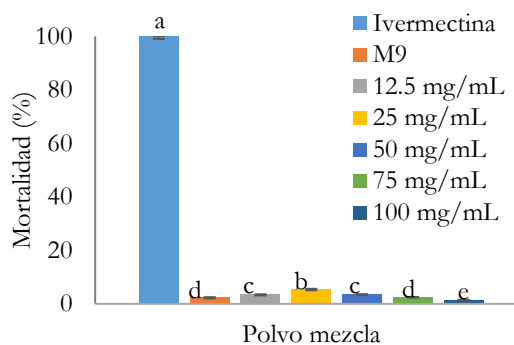


Figura 17. Toxicidad de PolC2

El ExtC1 fue el que presentó una toxicidad más elevada en comparación con los demás tratamientos evaluados. En la concentración de 100 y 25 mg/mL presentó

toxicidad de 14 % y la más baja fue para M9 con 8 % (Figura 18). El ExtC2 presentó la toxicidad más alta con 4 % a una concentración de 100 mg/mL y la más baja de 0.5 % a 25 mg/mL (Figura 19).

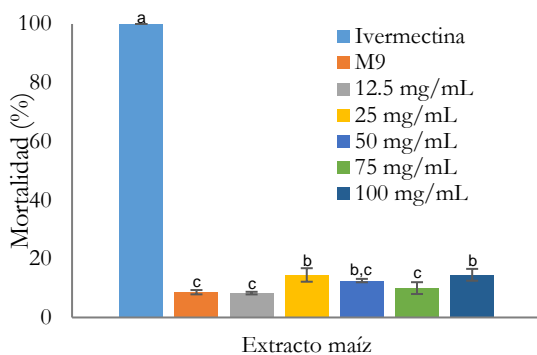


Figura 18. Toxicidad de ExtC1

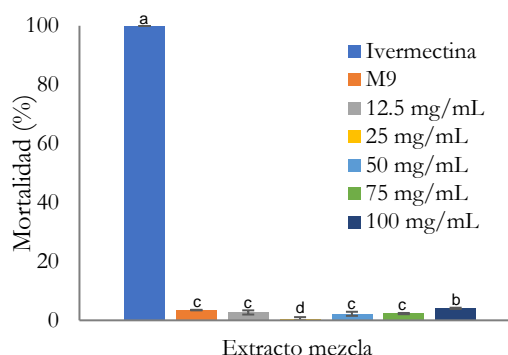


Figura 19. Toxicidad de ExtC2

Panagrellus redivivus se ha usado para evaluar la toxicidad de muestras ambientales de lodos, aguas residuales, sedimentos, suelos (Samoiloff *et al.*, 1983), compuestos y extractos. De una fusión celular entre *Cordyceps militaris* y *C. cicadae*, aislaron 13 compuestos y los compuestos 6, 9 y 11 mostraron una actividad inhibidora moderada contra el nematodo *P. redivivus* con una tasa de mortalidad de 79, 71.7 y 72.3 % a 2.5 mg/mL, respectivamente (Yang *et al.*, 2019). En este trabajo empleamos una concentración de 25 mg/mL diez veces mayor a la concentración reportada con anterioridad, la mortalidad más alta fue de 14.49 % para ExtC1 por lo que la presente investigación reporta una toxicidad menor al trabajo antes citado.

Un extracto clorofórmico del caldo de cultivo del hongo *Sterum* sp. se obtuvieron 5 compuestos sesquiterpenoides de cadinano denominados esterumina A (1), B (2), C (3), D (4) y E (5), de los cuales se evaluó la toxicidad con *P. redivivus*, la toxicidad más baja a las 24 h fue de 27.4 % para el compuesto 5 (200 mg/mL) y el más alto fue de 89.3 % para el compuesto 4 (400 mg/mL), a las 48 h la mortalidad más baja fue de 35.1 % para el compuesto 1 (200 mg/mL) y la más alta de 97.9 % para el compuesto 4 (400 mg/mL) (Li *et al.*, 2008). Del hongo termófilo *Talaromyces thermophilus* se aislaron los compuestos 5 mg (1) y 6mg (2), se evaluó la toxicidad utilizando el mismo nematodo en períodos de exposición de 6, 12, 18, 24 y 36 h. La mortalidad más alta fue de 40 % a 400 µg/mL a las

72 h para ambos compuestos y la más baja fue entre 7 a 9 % en concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 36 h para el compuesto 1 y 2 respectivamente (Chu *et al.*,2010), la mortalidad entre 7 a 10 % se coincide con lo reportado para M9 en el ExtC1.

También se ha evaluado la toxicidad de nanopartículas de plata (AgNP) producidas por *Bacillus pulminus* en concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24, 36 y 48 h. La mortalidad más alta fue en concentraciones de 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNP, con mortalidad del 80 y el 91 %, respectivamente, tras 48 h de exposición (Mahmoud *et al.*, 2016). En nuestro trabajo se empleó el mismo tiempo de exposición, pero con mayores concentraciones y la toxicidad fue más baja. Como tal no hay una guía de toxicidad para *P. redivivus* por lo que los extractos evaluados en las distintas concentraciones no se consideraron tóxicos debido a que presentaron una toxicidad menor al 20 % (Kiss *et al.*, 2018).

7.6 Pruebas de cicatrización *in vivo*

En el día 1, el ExtC1 y el control negativo (BU) presentaron mayor porcentaje de contracción (10 y 9.8 % respectivamente) y aquellos con menor porcentaje fueron el control positivo (UI), ExtC2 y PolC2 con 6 %. En el día 3, el control negativo (BU) presentó mayor porcentaje de contracción (24 %) y los de menor porcentaje fueron: PolC2 y UI con 9.5 y 8.4 %. Entre los días 0, 7, 11, 14 y 17 no hubo diferencias significativas (Figura 20).

De los 36 ratones empleados todos sobrevivieron hasta el cierre de la herida, el comportamiento fue igual para todos los tratamientos no se observaron molestias durante la aplicación. Las heridas de cada grupo evaluado no presentaron infección o inflamación e incluso antes de día 17 se comenzó a observar el crecimiento del pelaje (Figura 21).

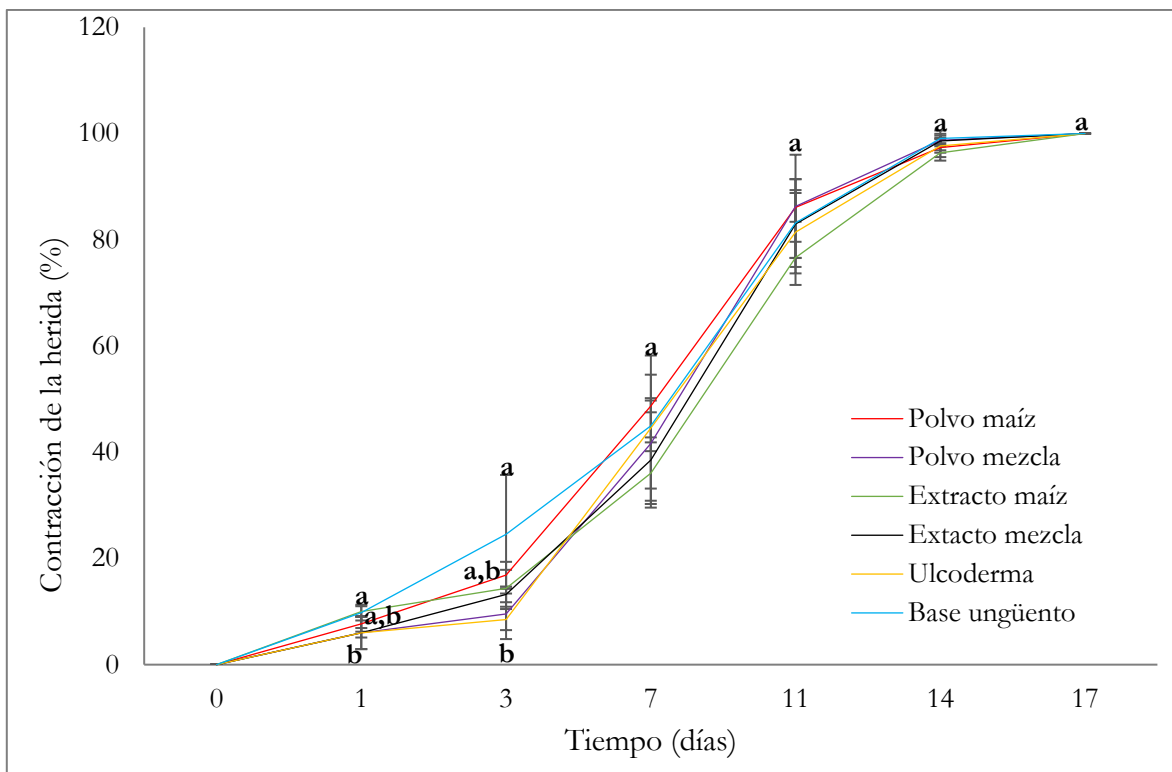


Figura 20. Porcentaje de contracción

Rajeshwaran *et al.* (2017) evaluaron un ungüento a base de un extracto metanólico de *D. concentrica* al 10 %, señalan que al día 21 hubo un porcentaje de cicatrización de 87.7 % comparado con 92.24 % de su control positivo (Neosporin®), en este trabajo, la cicatrización se presentó a los 17 días y en este mismo ya se había alcanzado el 100 % de cicatrización, por otra parte, el control positivo (Ul) en el día 1 y 3 mantuvo los porcentajes más bajos de contracción.

Se evaluaron heridas por escisión en ratas albinas de ambos sexos, bajo anestesia con éter dietílico. El grupo I, fue el control positivo y se trató con sulfadiazina de plata al 1 %, el grupo II, III, IV se trató con un ungüento simple que contenía extracto metanólico al 2.5 %, 5 % y 10 % p/p de las hojas de *Achyranthes aspera*, mientras que el grupo V sirvió como control negativo y fue tratado con ungüento simple (Fikru *et al.*, 2012). La cicatrización duró 21 días y se logró el 100 % de cicatrización para los extractos al 5 y 10 % coincidiendo con lo que nosotros reportamos.

Belachew *et al.*, 2020 evaluaron la cicatrización de heridas en ratones del extracto crudo de flores de *Hagenia abyssinica* al 80 % en metanol elaborando ungüentos al 5 % p/p y al 10 % p/p. Al día 16 el ungüento al 5 % logró el cierre de la herida, y el ungüento al 10 % en el día 14, presentando una cicatrización más baja a la reportada.

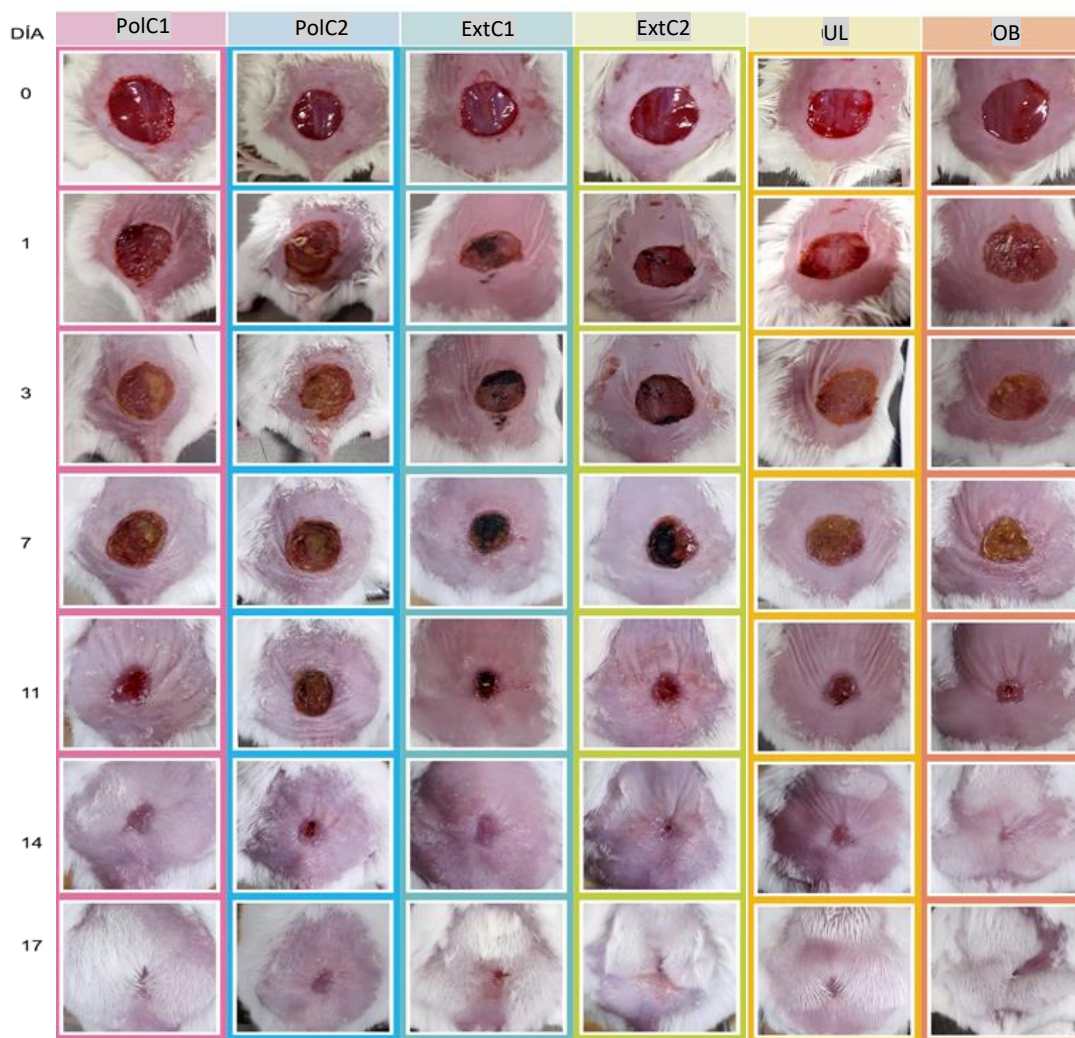


Figura 21. Contracción de las heridas

7.6.1 Evaluación macroscópica de los órganos

En la evaluación macroscópica de los órganos no se encontró ningún daño o alteración y presentaron una apariencia de un órgano sano, una coloración normal, sin protuberancias, abultamientos, petequias en el pulmón o irregularidades en la forma del

bazo (Tabla 6). Por lo que los ungüentos no tuvieron un efecto negativo en dichos órganos.

Timothy *et al.* (2019) realizaron un estudio de toxicidad subaguda de un extracto etanólico de *D. concentrica* en un modelo *in vivo* con ratas Wistar, administrando oralmente dosis de 200, 400 y 800 mg/kg a cada animal durante 8 días consecutivos y mencionaron que no hubo ningún efecto sobre los órganos analizados (corazón, hígado, bazo, riñones y pulmones), en este proyecto la administración no fue oral, sino que se aplicó la cantidad requerida de producto para cubrir la zona sin embargo, nos muestra un antecedente de que al menos esta especie no presentó daños adversos.

Tabla 6. Órganos extraídos

Tratamientos	Corazón	Bazo	Pulmones
PolC1			
PolC2			
ExtC1			
ExtC2			
UI			
BU			

7.7 Espectrofotometría de gases masa (GC/MS)

En total se obtuvieron 26 compuestos de (GC/MS) identificados y 3 desconocidos de las muestras ExtC1, ExtC2 y PolC2. En la tabla 7, podemos observar que PolC1 y PolC2 comparten los compuestos L-Arabinitol y .alpha.-D-Galactopyranoside, methyl. Hasta el momento estos compuestos no se han reportado para *D. eschscholtzii* por lo que podrían ser una nueva fuente de metabolitos secundarios. El compuesto 9 del PolC2 corresponde a un naftaleno, en la literatura hay reportes sobre derivados de naftalenos para *D. eschscholtzii* (Allport & Bu'Lock, 1960; Anke *et al.*, 1995). Compuestos derivados de

naftalenos se les ha reportado actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* y *S. aureus*, microorganismos patógenos en humanos (Hernández & Alomía, 2020).

Tabla 7. Compuestos de (GC/MS)

	TR	Compuesto	% Area
PolC2			
1	7.581	Spiro[7,8-diazatetracyclo[4.3.0.0(2,4).0(3,5)]non-7-ene-9,1 ¹ -cyclopropane]	15.59
2	7.73	desconocido	7.15
3	7.92	Tricyclo[4.1.1.0(7,8)]oct-3-ene	10.32
4	8.029	desconocido	7.62
5	8.572	Ethanone, 1-(2-pyridinyl)-, phenylhydrazone	14.08
6	9.088	1,4-Cyclohexadiene-1,2-dicarboxylic anhydride	4.94
7	9.441	Propanedinitrile, methylene-	11.57
8	10.032	desconocido	28.74
ExtC1			
1	16.956	Anthracene-9,10(9H,10H)-dione, 2-(1-pyrrolidinylsulfonyl)-	7.74
2	18.246	1-benzylindole	8.27
3	21.416	5-Chloro-2-nitrobenzyl alcohol	4.73
4	21.769	L-Arabinitol	48.34
5	24.03	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl	23.22
ExtC2			
1	7.16	dl-Threitol	4.36
2	7.377	Pyrimidin-4-ol, 6-amino-2-[1-(2-chlorophenyl)ethylthio]-	4.01
3	7.974	Cyclohexanooxazin-2(1H)-one, 3,9-dihydro-6,8-isopropylideno-9-methyl-	1.43
4	9.42	1,5-Hexadiyne	1.66
5	10.004	2-Azabicyclo[2.2.1]heptane	2.97
6	11.993	Pyrazolo[3,4-b]pyridin-3(2H)-one, 4-trifluoromethyl-2,6-diphenyl-	1.33
7	21.301	7-Acetoaminoflavanone	2.50
8	22.244	L-Arabinitol	59.96
9	22.916	Naphthalene, 9,1,4,5,8-tetrahydro-	1.28
10	22.991	4-Chloro-2-nitrobenzyl alcohol	2.19
11	23.181	2,6-Bis(diazo)adamantane	2.25
12	23.371	1-Deoxy-d-arabitol	1.26
13	23.616	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl	3.91
14	23.84	.alpha.-D-Mannopyranoside, methyl 3,6-anhydro-	2.14
15	24.037	Methyl-.beta.-D-thiogalactoside	3.74
16	24.512	2H-Benzocyclohepten-2-one, 3,4,4a,5,6,7,8,9-octahydro-	1.26
17	24.62	4-Chloro-2-nitrobenzyl alcohol	0.96
18	24.865	5-Keto-D-fructose	2.78

TR= Tiempo de retención, ExtC1= extracto maíz, ExtC2= extracto mezcla, PolC2= polvo mezcla

CAPÍTULO XIII. CONCLUSIÓN

- La cepa HEMIM-90 registrada como *Daldinia* sp. se identificó como *D. eschscholtzii*.
- Los resultados de velocidad de crecimiento del cultivo *in vitro* fueron más altos en la M1 (0.32 mm/h) y M3 (0.29 mm/h) lo que podría indicarnos que algunas mezclas de sustrato incrementan la velocidad de crecimiento.
- Los resultados de cultivo muestran que son factibles para obtener los estromas.
- Los ungüentos no presentaron toxicidad por lo que podría utilizarse con mayor seguridad en el área médica y también en la alimenticia.
- Se encontraron 26 moléculas por cromatografía de gases/masas (GC-MS).
- El hongo *D. eschscholtzii* presentó actividad cicatrizante y pueden explorarse sus propiedades terapéuticas.

CAPÍTULO IX. PERSPECTIVAS

- En primera instancia, optimizar las condiciones de cultivo para incrementar la productividad de *D. eschscholtzii*.
- Realizar estudios histológicos de las heridas en ratones para profundizar sobre los procesos que ocurren en la cicatrización como angiogénesis, fibroplasia, migración y proliferación de macrófagos y queratinocitos entre otros.
- Evaluar la cicatrización en líneas celulares ya que son rentables, fáciles de utilizar, manipular o expandir, se pueden mantener en cultivo durante períodos de tiempo más largos y se evitaría el uso de animales de laboratorio.
- Realizar el análisis de cromatografía de gases/masas del PolC1.
- Evaluar distintos sistemas de cultivo con la finalidad de obtener metabolitos secundarios y evaluarlos en la cicatrización.
- Utilizar herramientas de vanguardia como los estudios ómicos o la metabolómica con la finalidad de caracterizar células, genes o proteínas involucradas en la cicatrización de heridas y entender la dinámica celular y molecular de la reparación de tejidos.

CAPÍTULO X. LITERATURA CITADA

- Acosta-Urdapilleta, L. 2000. Aislamiento y cultivo de diferentes cepas silvestres de *Pleurotus* spp. en el Estado de Morelos, México. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/102783>.
- Acosta-Urdapilleta, L., Alonso-Paz, G. A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Montiel-Peña, M. & Villegas-Villarreal, E. C. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. *Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI*. Puebla, 531-562.
- Aguilar, Y. M., Bertot, R. R. & Pita, G. B. 2021. Análisis de los metabolitos secundarios del hongo *Ganoderma lucidum*. *Revista de Producción Animal*, 33(1).
- Allport, D.C. & Bu'Lock, J.D. 1960. 134. Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*. *Journal of the Chemical Society*, 654-662.
- Ambulkar, S., Ambulkar, P., Deshmukh, M. P. & Budhrani, A. B. 2020. Experimental evaluation of wound healing activity of various dosage forms of *Tridax procumbens*. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(4), 6579-6584.
- Anke, H., Stadler, M., Mayer, A. & Sterner, O. 1995. Secondary metabolites with nematicidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 932-939.
- Barbosa-Reséndiz, A., Valenzuela, R., Sánchez-Flores, M., Bautista-Hernández, S., Cobos-Villagrán, A., Pérez-Valdespino, A. & Raymundo, T. 2020. El género *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) en México. *Acta Botánica Mexicana*, (127), 1-32.
- Baum, C. L. & Arpey, C. J. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674-686.
- Belachew, T. F., Asrade, S., Geta, M. & Fentahun, E. 2020. *In vivo* evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of 80 % methanol crude flower extract of

- Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–12.
- Boddy, L., Gibbon, O. M. & Grundy, M. A. 1985. Ecology of *Daldinia concentrica*: Effect of abiotic variables on mycelial extension and interspecific interactions. *Transactions of the British Mycological Society*. 85(2), 201-211.
- Brito, B. J. 2022. Evaluación de *Daldinia* sp. como agente cicatrizante en un modelo *in vivo*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.
- Castro, M. I. 2006. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(2).
- Cheng, P. G., Phan, C. W., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Abdulla, M. A. & Kuppusamy, U. R. 2013. Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (MA Curtis: Fr.) P. Karst accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Child, M. 1932. The genus *Daldinia*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 19(4), 429-496.
- Chowdhury, M. M. H., Kubra, K. & Ahmed, S. R. 2015. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1-6.
- Chu, Y. S., Niu, X. M., Wang, Y. L., Guo, J. P., Pan, W. Z., Huang, X. W. & Zhang, K. Q. 2010. Isolation of putative biosynthetic intermediates of prenylated indole alkaloids from a thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Organic Letters*, 12(19), 4356-4359.
- Da Silva, G. R., Franklin, V., Cambuí, J. M., De Almeida, D. T., Wadt, N. S. Y., Cardoso, V. O. & Bach, E. E. 2018. Effect of *Agaricus sylvaticus* (Schaeffer) extract in rats skin wound healing. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 10, 7598-7600.
- de Diego Calonge, F. 2011. Hongos medicinales. Mundi-Prensa. México. 160 p.
- de la Torre, N. S., Bazán, D., Osorio, A., Cornejo, O. & Carrero, E. 2003. Deshidratación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 6(1), 55-59.

- de Lara, R., Castro, T., Castro, J. & Castro, G. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(1), 29-36.
- De Pasquale, A. 1984. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*, 11(1), 1-16.
- Dennis, R. W. G. 1968. British Ascomycetes. J. Cramer. Lehre, Germany, 455 p.
- Dutta, A. & Acharya, K. 2014. Traditional and ethno-medicinal knowledge of mushrooms in West Bengal, India. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4), 36-41.
- Esteva, E. 2006. El tratamiento de las heridas. *Offarm*, 25(8).
- Fallas, J. 2012. Análisis de varianza. Comparando tres o más medias, 54. Obtenido de http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP05/BLOQUEACADEMICO/Unidad2/complemen- tarias/analisis_de_varianza_2012.pdf.
- Fikru, A., Makonnen, E., Eguale, T., Debella, A. & Mekonnen, G. A. 2012. Evaluation of *in vivo* wound healing activity of methanol extract of *Achyranthes aspera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 469-474.
- Fuentes, F., Mendoza, R., Rosales, A. & Cisneros, R. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIAANIMALESRATON.pdf>
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez-Merlo, R. & Mata, G. 2006. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología AC, México, Xalapa, México.
- Gallardo, V. G. J. & Barboza M. L. 2015. Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de *Croton lechleri*" Sangre de Drago". *Revista Científica Ciencia Médica*, 18(1), 10-16.
- Gómez-Rodríguez, O., Pineda-Alegría, J. A., Castañeda-Ramírez, G. S., González-Cortazar, M., Sánchez, J. E. & Aguilar-Marcelino, L. 2022. *In vitro* nematocidal activity of the *Pleurotus djamor* PdR-2 fraction against J2 of *Meloidogyne enterolobii*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(2), 254-262.

- Guano, G. G. E. 2015. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en lesión, inducida en ratones (*Mus Musculus*) (Bachelor's tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba–Ecuador.
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P. & Landinez-Parra, N. S. 2013. Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 61(4), 441-448.
- Guo, S. A. & DiPietro, L. A. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
- Guzmán, G. 1997. Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina: Introducción a la etnomicobiota y micología aplicada de la región. Sinonimia vulgar y científica. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A.C. y la Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Xalapa, Veracruz, México. 357 p.
- Guzmán, G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3).
- Hernández, L. V. & Alomía, Y. A. 2020. Hongos endófitos en orquídeas: un meta-análisis global. Monografía de Pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia, 61.
- Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, A. Y., Hensel, A. & Deters, A. M. 2005. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 100-107.
- Jiménez, C. E. 2008. Curación avanzada de heridas. *Revista colombiana de Cirugía*, 23(3), 146-155.
- Ju, Y. M., Rogers, J. D. & San Martin, F. 1997. A revision of the genus *Daldinia*. *Mycotaxon*, 71, 518
- Kiss, L. V., Hrács, K., Nagy, P. I. & Seres, A. 2018. Effects of zinc oxide nanoparticles on *Panagrellus redivivus* (Nematoda) and *Folsomia candida* (Collembola) in various test media. *International Journal of Environmental Research*, 12(2), 233-243.

- Kwon, A. H., Qiu, Z., Hashimoto, M., Yamamoto, K. & Kimura, T. 2009. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocina induced diabetic rats. *The American Journal of Surgery*, 197(4), 503-509.
- Li, G. H., Duan, M., Yu, Z. F., Li, L., Dong, J. Y., Wang, X. B. & Zhang, K. Q. 2008. Stereumin A–E, sesquiterpenoids from the fungus *Stereum* sp. CCTCC AF 207024. *Phytochemistry*, 69(6), 1439-1445.
- Mahmoud, W. M., Abdelmoneim, T. S. & Elazzazy, A. M. 2016. The impact of silver nanoparticles produced by *Bacillus pumilus* as antimicrobial and nematicide. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1746.
- Martínez, D., Buglione, M., Filippi, M., Reynoso, L., Rodríguez, G. & Agüero, M. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. *Anales de Biología*, 37, 1-10.
- Mata, G. 1987. Introducción a la etnomicología de Yucatán. El conocimiento de los hongos en Pixoy, Valladolid. *Revista de la Sociedad Mexicana de Micología*, 3: 175-188.
- Miranda, M. M. & Cuéllar-Cuéllar, A. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. Ciudad de la Habana, Cuba, 147-170.
- Montalbano, G. 2018. Evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory, regenerative and wound healing properties of the bracket fungus *Ganoderma lucidum* (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology. Brisbane, Australia.
- Morales, O., Medel, R. & Guzmán, G. 2006. Primer registro de la comestibilidad de una especie de *Daldinia* (Ascomycota). *Revista Mexicana de Micología*, 23: 103-105.
- Moreno-Ortiz, V. C., Martínez-Núñez, J. M., Kravzov-Jinich, J., Pérez-Hernández, L. A., Moreno-Bonett, C. & Altagracia-Martínez, M. 2013. Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(4), 17-29.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477.

- Nigenda, G., Mora-Flores, G., Aldama-López, S. & Orozco-Núñez, E. 2001. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México*, 43, 41-51.
- Olmos, S. S. 2017. EMULSIONES (II). *Panorama actual del medicamento*, 41(404), 569-575.
- Osmanova, N., Schultze, W. & Ayoub, N. 2010. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 9(2), 315-342.
- Pancorbo-Hidalgo, P. L. 2016. Investigación sobre las heridas. *Gerokomos*, 27(3), 89-90.
- Pérez-Silva, E. 1973. El género *Daldinia* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 7, 51-58.
- Pineda-Alegría, J. A., Sánchez-Vázquez, J. E., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M. E., Cuevas-Padilla, E. J. & 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.
- Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. A. & Molina-Torres, J. 2004. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), 19-36.
- Proaño, E. J. P. 2013. Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de romero (*Rosmarinus officinales*), matico (*Pier aduncum*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*) en heridas inducidas en ratones (Tesis de licenciatura). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba-Ecuador.
- Qin, X. D., Dong, Z. J., Liu, J. K., Yang, L. M., Wang, R. R., Zheng, Y. T. & Zheng, Q. T. 2006. Concentricolide, an anti-HIV agent from the ascomycete *Daldinia concentrica*. *Helvetica Chimica Acta*, 89(1), 127-133.
- Rajeh, M. A. B., Kwan, Y. P., Zakaria, Z., Latha, L. Y., Jothy, S. L. & Sasidharan, S. 2012. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research*, 4(3), 170.

- Rajeshwaran, T., Sumathy, R. & Kumuthakalavalli, R. 2017. Wound healing effect of king Alferd's mushroom (*Daldinia concentrica*) used by tribes of Sirumalai hills, Tamilnadu, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(7), 161-164.
- Robles, L., Huerta, G., Andrade, R. H. & Ángeles, H. M. 2007. Conocimiento tradicional sobre los macromicetos en dos comunidades Tseltales de Oxchuc, Chiapas, México. *Etnobiología*, 5(1), 21-35.
- Royse, D. J. 1989. Factors influencing the production rate of shiitake. *Mushroom Journal for the Tropics*, 9(4).
- Ruan-Soto, F., Méndez, R. M., Cifuentes, J., Aguirre, F. L., Pérez-Ramírez, L. & Sierra-Galván, S. 2007. Nomenclatura, clasificación y percepciones locales acerca de los hongos en dos comunidades de la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Etnobiología*, 5(1), 1-20.
- Samoiloff, M. R., Bell, J., Birkholz, D. A., Webster, G. B., Arnott, E. G., Pulak, R. & Madrid, A. 1983. Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments. *Environmental Science & Technology*, 17(6), 329-334.
- Sandoval, E.S.M. 2022. Cultivo de *Daldinia eschscholtzii* sobre residuos agroindustriales. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca Morelos.
- Santamaría, B. E. J. 2014. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris* L.) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*) (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Segun, J., Olawuvi, O., Popoola, O. & Aina, D. 2011. Antibacterial activities of extracts of *Daldinia concentrica*. *African Journal of Biomedical Research*, 14(1), 57-61.
- Sharifi-Rad, J., Butnariu, M., Ezzat, S. M., Adetunji, C. O., Imran, M., Sobhani, S. R. & Martins, N. 2020. Mushrooms-rich preparations on wound healing: from nutritional to medicinal attributes. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 567518.

- Sobal, M., Martínez-Carrera, D., Morales P. & Roussos, S. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional*, 19(1): 15-23.
- Stadler, M., Læssøe, T., Fournier, J., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, H. V. & Peršoh, D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). *Studies in Mycology*, 77: 1-143.
- Subbulakshmi, M. & Kannan, M. 2016. Cultivation and phytochemical analysis of wild mushrooms *Daldinia concentrica* and *Pheolus schweinitzii* from Tamilnadu, India. *European Journal of Experimental Biology*, 6(3), 46-54.
- Timothy, O., Akpaja, E.O., Asemota, O. & Anyaduya, C.F. 2019. Sub-acute toxicity study of the ethanolic extract of cramp balls (*Daldinia concentrica* (Bolton) Ces. & De Not.) on Wistar albino rats. *African Scientist*. 20(1), 37-42.
- Tschierpe, H. J. & Hartmann, K. 1977. A comparison of different growing methods [Edible fungi]. *Mushroom Journal*, 60: 404-416.
- Velásquez, A, S. & Zaravia, A, L. M. 2014. Estudio comparativo de la composición química de las partes vegetativa y germinativa del hongo *Ganoderma lucidum*. (Tesis de licenciatura). Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Peru.
- Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Wasser, S. 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*, 37(6).
- Zhang, Y. L., Zhang, J., Jiang, N., Lu, Y. H., Wang, L., Xu, S. H. & Tan, R. X. 2011. Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(15), 5931-5940.
- Zolla, C. 2007. La salud de los pueblos indígenas de México [en línea]. [citado 2020-05-24]. Disponible en internet: www.naciónmulticultural.unam.mx/portal/pdf/.../salud_pueblos_indigenas.pdf.

Dictiotopografía

<https://www.douglaslabs.es/blog/terapia-enzimatica-sistemica-en-el-proceso-de-cicatrizacion/>

https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Anatomia-de-la-piel-Se-pueden-apreciar-sus-diferentes-capas_fig7_340261881

Cuernavaca, Mor., a 07 de febrero de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

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

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2023-05-18 19:29:13 | Firmante

hd26X64+7QyzVv1nbeolXekehzcNq+kdeYEMJxp3SpHXhb15zwNGsNFkmeGZ7Bt8ecap5ru0vjE6pFQ52hrpl7oaA8Ggka5aKF8PenzP79lOsofUnlbtUnHA0NewKEDiotZD3sD/oQe4UQ4Ey0lm/SxeYET8PwD+iLSzdER175pDoOC4Q9XiZ/wzLba/Kcf96k9TsttnflWM8LOas6KnfQEHHyiAcFj5s2HyANtlG6GZrjgeGnf8PbY6xMPV86WLTWJfGa1zdECxCpM12tE+HvhQx5sbPOjVDzXumPLrD598ebfCn/JZbc3l4xsYKsjdyrygP0SF/Zh8xcubSHw==

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



[WByLxdmk6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/rifpW8wjmPsjBRWjQEalQX9SuHhO3TRx>



Cuernavaca, Mor., a 07 de febrero de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

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

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2023-05-19 20:45:37 | Firmante

oYYtDK1In3cZ+zCRHVX0Rtzj5sdubA41x7fS/1VFsDJUmOW4F0xtXbTob5xv3G8Dg10xqGa7uDMVMSGdWIDWh7x4RdkybcCl22mgreNzTSMMaxnrpV3wnhdXam6UtiVFSui0E61r
yf5iR9EfHrr3MPmcGA/IY9FczzeGg3FiCu08plgicBGORySGI/q0JEdE1xc6OXK6cU1dyGug02kPNsan8gSxaqnOdcqcc+HB51ibhTLIH24Sf8HXCDfy3DV5xxAYAp4k33MkFSLgRa
l2DbXqXoAhN0i7e0GEuDjyr11P2/1q5Cnrdgji45fqkDCBOTE6YOpZbT2xbHA4+Bmi7w==

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



[fuc4tlwOJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0L79WrFY2QxPue4XL1PXwYT1kfBquK4r>



Cuernavaca, Mor., a 07 de febrero de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ
PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2023-05-20 14:21:06 | Firmante

KMVA0tpHqE9aSGkgnMo+PaTkzvrQMAVkdNOsTB5rMj59P0JkI6Qe+eSRImreZ+EvHrPe1uUjlojSzsgA6bZyysk0umeIUCKELqO+4InjkXWmPhx/Ux/VYFcE74paThW89rkbJ7Uq6/O+TYbSU0g6QMDdgvaMDylqM9pFldK5MimhnPcPP3WCBbtcmvsqNWcvTIRTZY0g6GTD+bHENj8xH7vuuHcUmjp2kvLM+5VO80RqEgmsd/Pgq2t/gNJI2IK5ENcuBIXzNpmAm2sQypRX+i0rG5yv7okTqmG303RVtabK4J8B+ZOnI7x1NOwC4h9H18JrvfkSnGQulfr80mg==

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



[Nio1xLHze](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sfKavw1K0wOOina7bdDIALmxYfXRqdzT>



Cuernavaca, Mor., a 07 de febrero de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO
PROFESORA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2023-05-19 10:38:44 | Firmante

scKIFYDLZrQhFFIkeB4YQomfXk8oHI0goPiiKeiVb43ZIHfiUdzBh87iJIHrntGIYEKSPs15gk8lygj5el7zhgtB3ua7HsauLA5pWbdEwGKaXi3sa2zROaGAZbnqj/gmMyK7T1mpxbLDzd/rfa5BQQrs28lsZAyeS7c13vUWUWTYiS7sMh5dN1w5AZTQ5Zq/CaJ+7LrEfeyE2cle/2qa5UOlyycC9x8VEL6pCrZx5+rdZgAqftMtP9zen6qSFkdS0NI41DgV8OF+BIPiflwJygoZO+uQlgRRZ3UTKjZug2tvC1X/X0awTHbXiXB3VLhp0GkpEgbZZ1f3WcM3Fixjw==

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



[p9Lm5EuTG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/R8llfW7iQtlyCm7GIWKIA87Wpc9DGpv>



Cuernavaca, Mor., a 12 de mayo de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

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

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-05-18 19:31:14 | Firmante

adhOriHmlyQJIHW4FEDZuwvp4f5tUBG0glkPzcgtp3HuBC4lx9a42o8KruUh9Q65hXGedDJJDLngloZPDbKcEj9DRwi5wobfspSBZ+vbIPOlwakQUuBj0rlrlxKEoCrOzScEqoaYHRJjJk7JnLbW2gKTCTVC0PERvblKWOGBgvll3eaGZ9/SMiODkcNcw8Pfh7twghuaC+7Ca5AAvOEIAHh0WaiXnLR+tOLLRbIfLjTc2JGJm91IXwF80A0acfXoSNqkCvIS6o3Xtj5OqvuNwkrEtMI0FHxbyPUFLpS9Mwz83oLYXd2J/pol8wv9j8XNK7LryrUq7OZSL8LCD54gWQ==

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



[UnmcPJT53](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/U7xfiWAXWguaKT05LvzqbBN13CwZ2Ylj>



Cuernavaca, Mor., a 12 de mayo de 2023

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

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **EVALUACIÓN DE *Daldinia eschscholtzii* EN LA CICATRIZACIÓN DE UN MODELO *in vivo***, que presenta la alumna **REYNA ISABEL CUEVA CLAVIJO**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

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

C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

ALEJANDRO GARCIA FLORES | Fecha:2023-05-22 22:29:58 | Firmante

VmrdP6qN1zq0JPwRumRXTVv0gswgvLmIWBOUWNg2WoN254/ltBe8jq1jdGbm/WZx6002ffDerzATwncphpXYIFKCo2fvBIJEnk7ieyjYGoSf5unDrLUvloYeb17DdmfbL95aapXmYG3J0CWTSqVrZ1FQtbQF6BOo377oOpFLA0SuQsAxiejD5J4IYmhYZF7XI3VYcSgd9XEFER/qmQATOIYjTH0HZp41nnK9K/90QqXMyhRYBbgUhO6sFd/yLcGETJ7ruecNnkq+8uAwwZM6Jobl8QQvPifw/4bXwQfqZYWwAwrULeeVKKP7RpuAQCDzNYFD/aTbdbNTb3YMwkng==

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



[YLvgE9GCI](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IWIYRj4DcvFIJNN06nKZIJP8H4c0i4Bv>

