



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE LAS PARTES AÉREAS DE
Asterohyptis stellulata (BENTH) EPLING (LAMIACEAE) EN LA CEPA
CD1 DEL MODELO MURINO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

OSCAR ALBERTO PADILLA-SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA MARÍA GARCÍA-BORES

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
ABRIL 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos académicos

Es importante destacar el apoyo institucional de los siguientes proyectos para el desarrollo del presente trabajo:

Proyecto PAPIIT IN212623, Estudio farmacognóstico de plantas empleadas para tratar padecimientos cutáneos en el centro de México.

Proyecto COMECYT FICDTEM – 2021 – 020. Estudio integral de *Asterohyptis stellulata*, una planta empleada para la curación de heridas en Tonatico, Estado de México, México.

Agradecimientos a título personal

Claro que a Bety, mi mamá preciosa, mi símbolo de fuerza y resiliencia. Por sembrar en mí los valores e ideales que hoy me hacen sentir orgulloso de ser quien soy. No sé cómo haces para no dejar de creer en mí, seguiré esforzándome. Te quiero mucho.

América PS, me recuerdas por qué quiero ser buena persona. Gracias por dejarme ser un ejemplo para ti y también por ser mi amiga.

Gilberto Huitrón, la persona más determinada que conozco, por compartir conmigo y enseñarme tanto durante los últimos años, por darme el apoyo que a veces no sé que necesito. Gracias por crecer a mi lado, Chino, te amo.

A mis amigas Lizbeth Monroy, Mitzi De La Rosa, Daniela Luna, Alexandra Vargas y Adriana Serna. El team que me salvó un poquito en la carrera y definitivamente en la vida. Las quiero y admiro mucho.

Elizabeth Ríos, Luz Portilla, Natalia Reséndiz, Daniela Trejo, Rodrigo Callejas y Mariana Rivera, gracias por no soltarme la mano en esos días que no fueron fáciles en este proceso. El cariño va de regreso.

Arath, Rouz, Susana, Eithan, Alexia, Liliana, Elí, Pablo, Javier, Yazmín, Osvaldo, Rubén y Edgar, ggg, por ofrecerme sana competencia intelectual xd, pero también su amistad y compañía. La carrera fue increíble con ustedes ahí, les deseo éxito.

A la Dra. Ana María García Bores, por recibirme como su tesista, pero sobre todo le agradezco infinitamente la paciencia, el gusto y motivación que ofrece al enseñar. Un ejemplo de quien me gustaría ser en mi vida profesional.

Al igual que a mis sinodales por sus amables revisiones, principalmente a Liliana Rubio y Montserrat Espinoza. Durante la carrera siempre mantuvieron vivo mi gusto por la Biología, les agradezco.

*“Hay una frontera que sólo nos atrevemos a cruzar de noche:
la frontera de nuestras diferencias con los demás,
de nuestros combates con nosotros mismos.”*

Carlos Fuentes

Índice general

Resumen	5
Introducción	6
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivos	12
Material y métodos	12
1. Obtención del material vegetal y el extracto	12
2. Análisis cualitativo del extracto crudo	13
3. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.	16
4. Actividad cicatrizante mediante prueba tensiométrica y cierre total de la herida	16
Resultados	18
1. Obtención del extracto	18
2. Detección cualitativa de metabolitos secundarios	18
3. Actividad antimicrobiana	19
4. Actividad cicatrizante por cierre total de la herida	20
5. Actividad cicatrizante por prueba del tensiómetro	22
Discusión	23
Conclusiones	30
Literatura citada	31

Resumen

La familia Lamiaceae es una de las más estudiadas y mejor conocidas en aspectos fitoquímicos y etnofarmacológicos a nivel global. *Asterohyptis* es considerado un género cercano a *Hyptis*; ambos grupos se encuentran dentro de la familia Lamiaceae. En la comunidad de Tonatico, *A. stellulata* se usa como agente cicatrizante en el tratamiento de heridas de animales de tiro. Hay registro de plantas cercanas a esta especie con diferentes actividades biológicas comprobadas como: antibacteriana, antimitótica, antifúngica y cicatrizante, entre otras. Dados los antecedentes de especies cercanas y el uso etnobotánico de la especie mencionada, el objetivo del presente trabajo es comprobar la actividad cicatrizante del extracto de los órganos vegetativos aéreos de *A. stellulata*. Para confirmar dicha actividad, primero se realizó el perfil fitoquímico preliminar del extracto metanólico mediante pruebas coloridas para detectar los principales grupos de metabolitos secundarios; con ellas, se encontraron fenoles, glucósidos, terpenos y esteroides. El extracto metanólico no mostró actividad antimicrobiana en las nueve cepas evaluadas. La actividad cicatrizante del extracto se evaluó en ratones CD1, midiendo la velocidad de cierre total de la herida y la fuerza de tensión posterior a la cicatrización. El extracto metanólico presentó una velocidad de cierre de herida de 1.78 ± 0.47 mm/día, y se requirieron 886 ± 141 g de fuerza; dichos resultados son similares a los obtenidos con el Recoverón® (C+), por lo que se concluye que la aplicación tópica del extracto crudo de *A. stellulata* sí favorece el proceso de cicatrización.

Introducción

La familia Lamiaceae es de las más estudiadas y mejor conocidas a nivel global, en las áreas de fitoquímica y etnofarmacología, debido a que muchos de los integrantes del grupo contienen gran cantidad de compuestos con importante actividad biológica. Además, existe registro del uso de especies de esta familia en medicina tradicional desde tiempos muy antiguos, que en México se remontan a las culturas prehispánicas (Frezza et al., 2019).

La familia Lamiaceae se encuentra entre las más diversas en México, con 236 géneros, presenta un endemismo del 65.82%. Las plantas de esta familia se distribuyen en zonas montañosas, especialmente en climas templados, como lo es a lo largo del eje Neovolcánico Transversal (Martínez-Gordillo et al., 2013; Martínez-Gordillo et al., 2017).

A pesar de la importancia ecológica, económica y posibles usos de las especies de la familia Lamiaceae, muchas plantas del grupo no cuentan con estudios integrales. De hecho, se desconoce el estado de conservación, así como la distribución y demás información especializada de la mayoría de las especies, lo cual las pone en riesgo. Además, este desconocimiento, no propicia su conservación y tentativo aprovechamiento. Por lo anterior, es necesario realizar estudios profundos y diversificar los campos de investigación alrededor de la familia y las especies que la integran (Martínez-Gordillo et al., 2017).

El género *Asterohyptis* fue separado de *Hyptis* en 1933 por Epling, por lo que se consideran como clados cercanos. Ambos géneros forman parte de la familia Lamiaceae y es posible encontrar especies de los dos grupos en regiones secas y cálidas del país (Martínez-Gordillo et al., 2013), que corresponden a los climas BSh y BSk (García, 2004).

Dada la cercanía cladística de los géneros *Hyptis* y *Asterohyptis* y la poca información referente a la fitoquímica de *Asterohyptis*, para efectos de esta investigación se buscaron también antecedentes de *Hyptis*.

El género *Asterohyptis* se distingue de *Hyptis* principalmente por diferencias morfológicas del cáliz; aunque también se puede diferenciar por las numerosas flores pequeñas, arregladas en grupos axilares, lóbulos de la corola no separados y anteras no explosivas (Turner, 2011).

Este género se conforma por cuatro especies: *A. nayarana*, *A. seemannii*, *A. mociniana* y *A. stellulata*, todas ellas restringidas a México y Centroamérica. Particularmente, la especie *A. stellulata* se distribuye en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, Morelos, Veracruz, Puebla, Guerrero y Oaxaca; así como en algunas regiones de América Central (Turner, 2011).

A. stellulata es la especie tipológica del género *Asterohyptis*. Se trata de una planta sufruticosa que puede encontrarse en forma de hierba o arbusto perenne, de 1 a 4 m de alto, con hojas ovadas a lanceoladas de 2 a 3 veces más largas que anchas (Turner, 2011).

A. stellulata a nivel nacional se conoce como 'chía', 'cordón de San Antonio', o 'Salvia cimarrona' (CONABIO, s.f.). En Tonalico, Estado de México se le conoce como 'barrotero'; ahí se utiliza de forma tópica como cicatrizante para tratar heridas de animales de tiro (comunicación oral).

La cicatrización es un proceso vital en todos los organismos, que restaura la integridad de la piel. Este órgano es un medio de defensa de las condiciones ambientales y una de las principales vías de comunicación con el entorno. La cicatrización es la respuesta fisiológica natural a la herida de un tejido, que necesita ser reparado, con el fin de recuperar la estructura y función normal.

Consiste en un complejo proceso de cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Estas etapas usualmente tienen lugar de forma acoplada, por lo que su equilibrio es fundamental para la correcta reparación de la zona dañada (Peng-Hui et al., 2018).

Las etapas de la cicatrización y las funciones bio-fisiológicas que cumplen deben ocurrir en la secuencia adecuada, en el momento correcto y continuar por un tiempo específico a una intensidad óptima (Guo y DiPietro, 2010); la conclusión de todas las etapas conduce al cierre de la herida (Jones et al., 2004).

Las heridas crónicas y/o agudas que presentan una cicatrización deficiente, generalmente tienen fallas en el progreso normal de las etapas del proceso de reparación. Estas heridas con frecuencia entran en procesos de inflamación patológica (Guo y DiPietro, 2010).

Los factores que afectan alguna o varias de las etapas de la cicatrización son diversos y pueden dividirse en locales y sistémicos. Los factores locales son aquellos que influyen directamente en las características de la herida, tales como oxigenación e infecciones. Mientras que las causas sistémicas se deben al estado de salud o enfermedad del individuo, que afectan su habilidad de cicatrizar (Guo y DiPietro, 2010).

La infección de una herida puede definirse como la presencia de organismos replicándose dentro de una herida con subsecuente daño al hospedero. La principal etapa de la cicatrización que se ve afectada a causa de infecciones es el proceso inflamatorio (Jones et al., 2004).

Agyare et al. (2016) realizaron un artículo de revisión en el que registraron la actividad cicatrizante comprobada de plantas pertenecientes a 36 familias botánicas, entre ellas Lamiaceae. De esta última, los géneros *Occimum*, *Hoslundia*, *Leucas*, así como *Hyptis*, se encuentran en el listado.

Picking y colaboradores en 2013 reportaron al género *Hyptis* como una notable fuente de componentes bioactivos, entre ellos: lignanos, alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, polifenoles y flavonoides, entre otros; con propiedades biológicas como antimicrobiana, anticancerígena e insecticida.

Las plantas del género *Hyptis* han sido empleadas en la medicina tradicional de al menos diez países (siete Centroamericanos, incluido México). Resalta que varias especies han sido —históricamente— importantes plantas medicinales en los trópicos; se han usado para tratar padecimientos, tanto internos, (algunos asociados al sistema respiratorio, tracto gastrointestinal, sistema ginecológico, sistema músculo-esquelético); como externos (en algunas afecciones de la piel) (Picking et al., 2013).

De acuerdo con Picking et al. (2013), el ‘epazotillo’ (*H. verticillata*) es usado en la medicina tradicional de Oaxaca para tratar problemas de la piel y cicatrización de heridas. Además, se ha comprobado que los extractos y compuestos de esta planta poseen actividad antimitótica, antiproliferativa, citotóxica, antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-VIH, antisecretora, hepatoprotectora, insecticida y acaricida.

En Cuetzalan, Puebla, *H. verticillata* se usa para tratar enfermedades como catarro, resfriado y secreciones acuosas. El tratamiento se hace aplicando un pequeño tamal de las hojas calientes en el área afectada (Ocampo y Balick, 2009).

Chitra y colaboradores en 2009 evaluaron la actividad cicatrizante de *H. suaveolens* (L) Poit., una importante planta medicinal usada en la India. Evaluaron el porcentaje de cicatrización, tiempo de re-epitelización, fuerza de tensión, entre otros parámetros, en ratas Wistar. Demostraron que un extracto de hojas con éter de petróleo tuvo importante actividad cicatrizante, comparado con un extracto acuoso y uno alcohólico de la misma planta.

Asimismo, Chitra et al. (2009) afirmaron que es necesario realizar estudios más profundos que nos permitan entender el mecanismo de la propiedad cicatrizante de la planta que evaluaron.

A la fecha se cuenta con un registro que comprueba la actividad citotóxica de un extracto acuoso de *A. stellulata* sobre un modelo de adenocarcinoma de duodeno en hámster (Jacobo-Herrera et al., 2016).

En otro estudio, realizado por Pedersen (2000), se descartó la presencia de algunos dihidroxi fenoles en el extracto etanólico de los órganos vegetativos aéreos de la planta, mediante un análisis de espectrometría de resonancia de espín de electrones.

Álvarez-Santos et al. en 2022 reportaron que el extracto metanólico de *A. stellulata* presentó actividad cicatrizante en ratones macho jóvenes (6-8 semanas) de la cepa CD-1 et/et. Dicha actividad cicatrizante se atribuyó a la presencia de compuestos derivados de quercetina y del ácido rosmarínico presentes en el extracto; los cuales promueven la cicatrización al reducir el tiempo de cierre de herida, aumentando la síntesis de colágeno y disminuyendo posibles infecciones.

Justificación

Es importante ampliar el conocimiento que se tiene de las plantas de la familia Lamiaceae en el campo de la fitoquímica, debido a la gran cantidad de compuestos con actividad biológica ya reportados en algunos géneros. Resulta conveniente estudiar la posible actividad biológica de algunas plantas y los diversos compuestos involucrados; en este caso, la actividad cicatrizante en heridas de animales de tiro que se atribuye a *A. stellulata*. A la vez, es de interés investigar si dicha actividad se ve favorecida por el efecto antimicrobiano del extracto; ya que se ha reportado esta actividad en otras plantas de la familia y como se mencionó, las infecciones son factores que afectan el proceso de cicatrización. Así, será posible proponer nuevas formas de uso y aplicaciones de la planta; además de comenzar la conversación acerca de la conservación de la especie. Por ello, este trabajo pretende dar respuesta a las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuáles son los principales grupos de metabolitos que componen el extracto metanólico de *A. stellulata*? ¿tendrá el extracto actividad cicatrizante en ratones CD-1? y ¿esta actividad se ve promovida por un efecto cicatrizante del mismo extracto?

Hipótesis

A. stellulata 'barrotero' es utilizada como agente cicatrizante en heridas de animales de tiro en algunas comunidades de Tonatico, Estado de México. La actividad cicatrizante de especies de géneros cercanos a *Asterohyptis*, se ha comprobado. Por lo tanto, se espera que el extracto crudo obtenido de los órganos vegetativos aéreos de *A. stellulata* muestre dicha actividad en la cepa CD1 del modelo murino.

Objetivos

Objetivo principal

Comprobar la actividad cicatrizante del extracto crudo de los órganos vegetativos aéreos (tallos y hojas) de *A. stellulata* en ratones de la cepa CD1.

Objetivos particulares

Obtener el extracto de *A. stellulata* empleando las técnicas de maceración y destilación a presión reducida.

Caracterizar preliminarmente el contenido fitoquímico del extracto obtenido mediante pruebas coloridas.

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto crudo de *A. stellulata*.

Determinar la actividad cicatrizante del extracto crudo de *A. stellulata* en la cepa CD1 del modelo murino mediante los métodos de cierre total de la herida y tensiométrico.

Material y métodos

1. Obtención del material vegetal y el extracto

Los órganos vegetativos aéreos de ejemplares de *A. stellulata* fueron recolectados en la comunidad de “San José de los Amates” en Tonalico, Estado de México; durante el mes de septiembre del 2019.

El material recolectado fue posteriormente identificado en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM; un ejemplar de *A. stellulata* se integró a la colección del herbario con el número de registro: 3303-IZTA.

La extracción de los componentes presentes en las hojas y tallos de *A. stellulata* se realizó con el método de maceración con solventes. Se pesaron

582.2 g del material vegetal seco, este se trituró y dejó reposar con metanol en ciclos de 24 horas en matraces de 4L.

El solvente del material macerado fue filtrado y se destiló a presión reducida para la obtención del extracto crudo. El rendimiento del extracto obtenido se calculó considerando la diferencia del peso del material seco (donde 582.2 g representan el 100%) en relación con los sólidos totales obtenidos luego de la destilación.

2. Análisis cualitativo del extracto crudo

En el análisis cualitativo del extracto metanólico de *A. stellulata* se emplearon métodos estándar de detección de fenoles, alcaloides, glucósidos, saponinas, terpenos, cumarinas y esteroides (Asghari et al., 2017; Geethika y Sunoj, 2017). Dicha caracterización preliminar de metabolitos secundarios se realizó con una dilución del extracto crudo en metanol (1 mg/mL).

Fenoles: Este tipo de compuestos generan un precipitado oscuro en presencia de cloruro férrico (FeCl_3). Debido a que el ion cloruro reacciona con el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos generales; logrando que se rompa el enlace y formando a su vez un complejo de color intenso con el Fe (III) del reactivo (Coy-Barrera et al., 2014).

Para esta prueba se agregaron de 2 a 3 gotas del reactivo FeCl_3 a 400 μL de la dilución del extracto. El cambio de coloración del extracto a verde o azul fue considerado positivo.

Alcaloides: a 1 mL de la dilución del extracto crudo se agregaron gotas de reactivo de Dragendorff y reactivo de Mayer en tubos separados; la aparición de precipitado naranja/rojo y amarillo/blanco, respectivamente, indica la presencia de alcaloides (Kancherla et al., 2019).

El mecanismo de acción del reactivo de Dragendorff es poco conocido; la manera en que se da la reacción colorida provocada por este reactivo puede ser la siguiente: La mayoría de los alcaloides tienen un grupo amino; dicho grupo puede reaccionar de forma parecida al amoníaco (NH_3) e interactuar como una base que, al reaccionar con un ácido, puede formar sal de amonio (Raal et al., 2020).

Una reacción de intercambio de iones toma lugar entre la sal de amonio formada y el tetrayodo bismutato de potasio presente en el reactivo de Dragendorff, generando un complejo salino insoluble (Raal et al., 2020).

En el reactivo de Mayer, el yoduro de potasio reacciona con el cloruro mercúrico, formando un precipitado rojo de yoduro mercúrico: $[\text{HgCl}_2 + 2\text{I}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- + \text{HgI}_2]$ soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro: $[\text{HgI}_2 + \text{I}^- \rightarrow \text{HgI}_4^{2-}]$. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma un compuesto de color pardo, el oxiyoduro mercuriamoníaco, que es soluble en exceso de complejo $[\text{HgI}_4^{2-}]$, generando intenso color amarillo (Coy-Barrera et al., 2014).

Glicósidos: La detección preliminar de carbohidratos en una muestra suele realizarse con la prueba de Molisch, cuyo reactivo consiste en una mezcla de α -Naftol al 5% y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Esta prueba está basada en la deshidratación de los carbohidratos de una muestra por la acción del H_2SO_4 , convirtiéndose en aldehídos que al interactuar con el α -naftol del reactivo generan un producto condensado de color púrpura (Rathod et al., 2022).

Para comprobar la presencia de glicósidos, se agregaron 2-3 gotas de reactivo de Molisch, a la dilución del extracto de *A. stellulata*. La aparición de un anillo púrpura en la dilución del extracto es resultado positivo para esta prueba.

Saponinas: la búsqueda de saponinas se realizó agitando vigorosamente la dilución del extracto crudo, luego de agregar de 1 a 2 mL de agua aproximadamente. Esperando la permanencia de la espuma formada después de dejar reposar el extracto por 5 minutos como resultado positivo (Kancherla et al., 2019).

Terpenos: con la dilución del extracto de la planta, se desarrolló una cromatografía en placa fina de gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano-acetato de etilo en concentración 8:2 como fase móvil. Al término de la cromatografía, se revelaron con vainillina y ácido sulfúrico concentrado para comprobar la presencia de monoterpenos. Posteriormente, las placas obtenidas se calentaron en una parrilla a 110°C durante 5-10 min; observar bandas rosas o moradas en la placa revelada indicaría positivo a la presencia del grupo mencionado (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

Cumarinas: la prueba de detección de cumarinas se llevó a cabo en una cromatografía en capa fina con las mismas condiciones que la realizada en la prueba para terpenos. Esta vez, la placa seca se asperjó con hidróxido de potasio (KOH) al 5 % diluido en etanol. Posteriormente fue revelada con luz UV (365 nm) para comprobar la presencia de cumarinas, que se manifiestan como franjas azules en la placa (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

Esteroides: La reacción de Liebermann-Burchard fue realizada para la detección de esteroides. La reacción se desarrolló diluyendo 0.1g del extracto en 2 mL de cloroformo, a continuación, se agregó 1 mL de anhídrido acético y 1mL de ácido sulfúrico concentrado; esta reacción forma ácido sulfónico, derivado del colesterol disuelto en el ácido acético (Nath et al., 1946).

En el ensayo de Liebermann-Burchard el cambio en la coloración a verde/azul es considerado como resultado positivo (Chaudhary et al., 2010).

3. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.

Para determinar si el extracto de una planta presenta actividad antimicrobiana suele recurrirse al método de difusión en agar (Kirby-Bauer), ya que es una técnica estandarizada para evaluar el crecimiento de patógenos y su resistencia a diferentes agentes. La reproducibilidad de este método depende de la fase de crecimiento del organismo, por lo que se utilizan subcultivos de la cepa a evaluar (Sandle, 2016).

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer en 5 cepas de *Staphylococcus aureus* (23MR, ATCC2921, cc, CUSI y FES-C), 2 cepas de *S. epidermidis* (ATCC 12228 y FES-C) y en 3 hongos levaduriformes del género *Candida* (*C. albicans* 17MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*); todas las cepas obtenidas del Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales de la Unidad de Biología y Prototipos de la FES Iztacala.

Las cepas de *Staphylococcus* fueron inoculadas e incubadas en cajas Petri con agar Muller-Hinton, mientras que los hongos del género *Candida* fueron incubados en agar PDA.

En cada caja se colocaron 3 sensidiscos impregnados con 20 µL del extracto crudo (2 mg). Sensidiscos impregnados de metanol fungieron como control negativo (C-) y se utilizaron discos distintos impregnados con cloranfenicol (antibiótico de amplio espectro) como control positivo (C+) (0.5 g/100 mL).

4. Actividad cicatrizante mediante prueba tensiométrica y cierre total de la herida

Ratones macho de la cepa CD-1 de 6 a 8 meses de edad, procedentes del BIOTERIO de la FES-Iztacala, se dividieron al azar en 3 grupos (5 n): control positivo (Recoverón®, C+), control negativo (Vaselina, C-) y experimental (extracto crudo al 5% con vaselina como vehículo).

Todos los ratones sujetos a la prueba fueron depilados dorsalmente con crema *Nair*® piel sensible y se dejaron descansar un día para el posterior procedimiento.

Los ratones fueron anestesiados individualmente con 100 µL de isoflurano (99.9%); durante su adormecimiento se les realizó una herida (incisión) de 1.5 cm de longitud en el dorso. Pasadas 24 horas (día 1), los tratamientos fueron aplicados de forma tópica con una espátula y hasta cubrir la herida; C+ (Recoverón®), C- (vaselina) y experimental (extracto al 5%).

La longitud de la herida en el dorso de los ratones fue medida y registrada, desde el día en que se realizó la incisión (día 0) y hasta el momento en que se practicó su eutanasia (día 14). Las mediciones se hicieron con ayuda de un vernier electrónico calibrado en milímetros. Con los datos obtenidos se calculó la velocidad de cierre de la herida para cada tratamiento aplicado. Los datos de esta prueba fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas.

La eutanasia de los ratones se hizo con una cámara de CO₂, para realizar posteriormente la evaluación tensiométrica. Dicha prueba consiste en medir la resistencia que la piel cicatrizada ofrece a cierta fuerza de tensión aplicada antes de romperse. Ello se hizo con ayuda de un dinamómetro calibrado en 1000 g (Álvarez, 2019). Los datos de esta prueba fueron analizados mediante un ANOVA.

Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo con la norma NOM062-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la FES-Iztacala (CE/FESI/092017/1200, 9, 27, 2017).

Resultados

1. Obtención del extracto

El extracto crudo que se obtuvo de las hojas y tallos de *A. stellulata* a partir del método de maceración con metanol tuvo un rendimiento de 107.99 g. Lo que representó el 18.55% del material seco vegetal empleado (582.2 g).

2. Detección cualitativa de metabolitos secundarios

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los resultados de las pruebas coloridas y ensayos estándar para detectar metabolitos secundarios, realizados al extracto metanólico de hojas y tallos de *A. stellulata*.

Las pruebas de detección de ocho grupos de metabolitos secundarios indicaron que el extracto resultó positivo para cuatro de ellos: fenoles, glucósidos, terpenos y esteroides.

La reacción con cloruro férrico (FeCl_3) resultó positiva para fenoles.

El extracto no reaccionó con los reactivos de Dragendorff y de Mayer, por lo que se consideró que no contiene alcaloides.

La prueba de glucósidos se realizó con alfa-naftol y ácido sulfúrico concentrado; al agregar ácido sulfúrico al extracto se formó un anillo púrpura en el tubo de ensayo, lo cual indicó resultado positivo para este análisis.

Después de agitar la mezcla del extracto diluido-agua la espuma formada no permaneció más de un par de segundos, por lo cual se considera negativo para saponinas.

El revelado de la placa cromatográfica con vainillina y ácido sulfúrico presentó varias bandas de color rosa/lila en la placa; resultado positivo para terpenos.

Más tarde, la placa cromatográfica usada para la detección de cumarinas, luego de ser revelada no mostró ninguna banda al ser expuesta a luz UV, lo cual se consideró como resultado negativo para esta familia de moléculas.

La reacción Liebermann-Burchard resultó en un cambio de coloración de amarillo a verde en el extracto evaluado, resultado positivo para la presencia de esteroides.

Tabla 1. Perfil fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de hojas y tallos de *A. stellulata*.

Metabolito secundario	Reacción
Fenoles	+
Alcaloides	-
Glucósidos	+
Terpenos	+
Saponinas	-
Cumarinas	-
Esteroides	+

(+) Reacción positiva; (-) Reacción negativa.

3. Actividad antimicrobiana

De las 9 cepas microbianas que se utilizaron en el ensayo de Kirby-Bauer, ninguna mostró ser inhibida por el tratamiento con extracto crudo de *A. stellulata*; el control positivo mostró diversos tamaños del halo de inhibición (de 12 mm a 22.5 mm), mientras que el control negativo también resultó sin actividad sobre las cepas. En la Tabla 2 se muestra el resumen de la prueba de actividad antimicrobiana del extracto metanólico de hojas-tallo de *A. stellulata*.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de *A. stellulata* por el método de difusión en agar.

<i>Microorganismo</i>	Cepa	Extracto metanólico	Cloranfenicol (C+)	Metano I (C-)
		Halos de inhibición (mm) ± Desviación estándar		
<i>S. aureus</i>	23 MR	SA	20.5 ± 0.5	SA
	ATCC 29213	SA	12 ± 0	SA
	cc	SA	13 ± 0	SA
	CUSI	SA	22.5 ± 0.5	SA
	FES - C	SA	17.5 ± 0.5	SA
<i>S. epidermidis</i>	FES – C	SA	20.5 ± 0.5	SA
<i>C. albicans</i>	17MR	SA	SA	SA
<i>C. glabrata</i>		SA	SA	SA
<i>C. tropicalis</i>		SA	SA	SA

Promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones cada uno ± desviación estándar. (SA) Sin actividad.

4. Actividad cicatrizante por cierre total de la herida

La herida inicial en los ratones (día 0) fue una incisión dorsal de 15.39 ± 0.67 mm de longitud. Dicha herida se midió durante los 14 días subsecuentes, en los que se aplicaron los tres tratamientos, con el fin de obtener la velocidad y tiempo de cierre de las heridas (mm/día). Estos resultados se muestran en la Figura 1.

La velocidad de cierre de herida del grupo de ratones a los que se aplicó el Recoverón® (C+) fue de 1.06 ± 0.81 mm/día, la velocidad de cierre de herida obtenida de los ratones tratados con vaselina (C-) fue de 0.96 ± 0.76 mm/día y para el grupo que fue tratado con el extracto metanólico de *A. stellulata* se registró una velocidad de cierre de herida de 1.78 ± 0.47 mm/día.

El control negativo (vaselina) no mostró efecto sobre la velocidad de cicatrización de la herida; mientras que el tratamiento con extracto metanólico de *A. stellulata* tuvo una velocidad de cierre de herida similar a la registrada en el control positivo (Recoverón®).

Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, ya que se observa que la velocidad de cierre de herida registrada en los ratones tratados con el extracto metanólico y con Recoverón® (C+) es muy similar y a su vez estas son superiores a la velocidad de cierre de herida para los ratones tratados solo con vaselina (C-) (Figura 1).

Es importante mencionar que las heridas de los ratones en los grupos tratados con Recoverón® y con el extracto metanólico de *A. stellulata*, tuvieron una mejor apariencia desde los primeros días (Figura 2) y cicatrizaron por completo para el día 13, en tanto que los ratones tratados solo con vaselina no completaron la cicatrización para el término del experimento al día 14 (Figura 1).

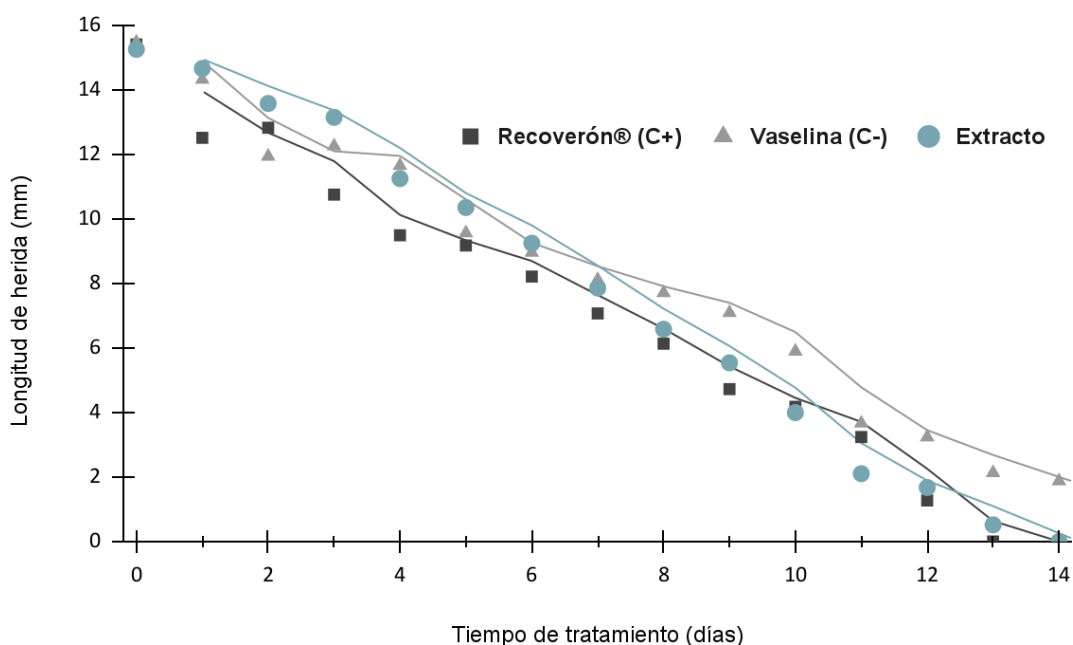


Figura 1. Evaluación de la actividad cicatrizante por velocidad de cierre de la herida (VCH), obtenida mediante la longitud de la herida expresada en mm por 15 días de tratamiento (n=5).

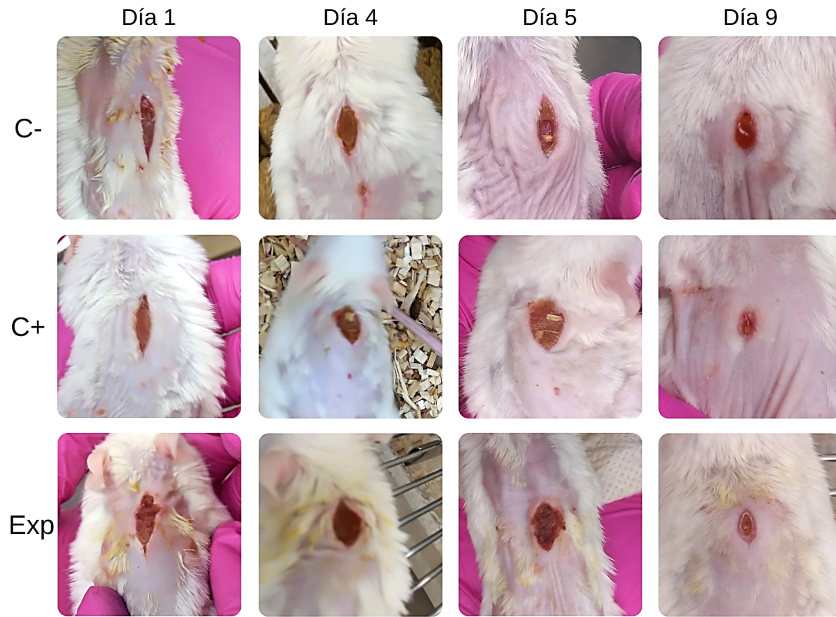


Figura 2. Apariencia de las incisiones dorsales, comparando los tres tratamientos, durante los primeros 9 días del ensayo.

5. Actividad cicatrizante por prueba del tensiómetro

La evaluación de la actividad cicatrizante por el método tensiométrico, que considera la fuerza necesaria para reabrir la herida, produjo los siguientes resultados: en los ratones tratados con Recoverón® (C+) se requirió una fuerza promedio de 804 ± 210 g para reabrir las heridas, las incisiones del grupo al que se aplicó vaselina (C-) requirieron 690 ± 193 g y fueron necesarios 886 ± 141 g para el grupo tratado con el extracto metanólico de *A. stellulata*.

Aunque no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 3), puede observarse una tendencia al aumento en la fuerza necesaria para reabrir las heridas de los ratones a los que se les aplicó el extracto metanólico de *A. stellulata*, con respecto a los otros dos grupos.

Además, durante el ensayo se observó que dos de los individuos del grupo tratado con extracto crudo, requirieron más tiempo para reabrir sus heridas en contraste con los otros tres individuos del grupo experimental. Ello sugiere que usar un dinamómetro con una calibración mayor a 1000 g hubiese ayudado a obtener un resultado más preciso.

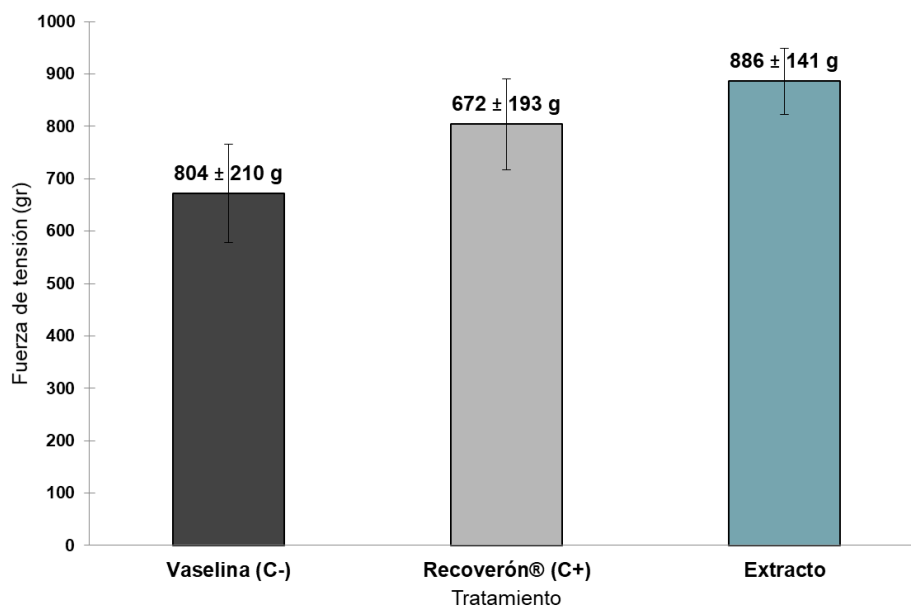


Figura 3. Evaluación de la actividad cicatrizante por el método tensiométrico, medido en gramos. Se muestra el promedio de cinco repeticiones \pm error estándar.

Discusión

El perfil fitoquímico de *A. stellulata* obtenido coincide con el realizado por Álvarez-Santos (2022) quien registró fenoles, terpenos, glicósidos y esteroides en un extracto metanólico de la misma especie. También se encuentra coincidencia con el contenido reportado por Álvarez-Cruz (2022).

Los fenoles en el extracto metanólico de *A. stellulata* en este estudio no coinciden con lo encontrado por Pedersen (2000) que descarta la presencia de diversos dihidroxi-fenoles en el extracto etanólico y hexánico de la especie basado en un análisis de espectroscopia de resonancia del giro electrónico.

La diferencia del contenido fitoquímico de *A. stellulata* entre este estudio y el de Pedersen (2000) puede tener diferentes causas, una de ellas es que particularmente los ejemplares que se usaron en el análisis de Pedersen, no contenían estos compuestos. Además, este autor buscaba dihidroxi-fenoles, un tipo muy específico de fenoles, mientras que en este estudio la búsqueda fue más general debido a que la prueba detecta compuestos fenólicos donde los grupos hidroxilo 'quelan' el cloruro férrico y forman el precipitado.

Hyptis, el género más cercano a *Asterohyptis*, cuenta con diversos estudios en fitoquímica por lo que es posible usarlos como referentes para este análisis. Por ejemplo, en los órganos vegetativos aéreos de *H. verticillata* se han encontrado 37 compuestos distintos, que corresponden a diferentes grupos de metabolitos secundarios como: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lignanos, alcaloides ((R)-5-hidroxipirrolidina-2-ona), polifenoles (ácido rosmarínico) y flavonoides (Picking et al., 2013). El extracto metanólico estudiado en este proyecto, coincide con la presencia de terpenos y fenoles del estudio mencionado; sin embargo, no hubo reacción positiva para alcaloides.

En 2013 Dian-Hong et al., analizaron el contenido fitoquímico del aceite esencial de los órganos vegetativos aéreos de tres especies de *Hyptis*: *H. suaveolens*, *H. rhomboidea* e *H. brevipes*. Identificaron 62 compuestos diferentes en total, los elementos principales son monoterpenos, sesquiterpenos y fenoles en las tres especies. Los compuestos mencionados coinciden con la presencia de terpenos y fenoles en el extracto metanólico del presente trabajo; sin embargo, en el estudio citado se presentaron diferencias en la proporción de familias de metabolitos secundarios según la especie.

La actividad antioxidante del aceite esencial de las tres especies de *Hyptis* (*H. suaveolens*, *H. rhomboidea* e *H. brevipes*), así como el efecto antimicrobiano sobre 4 cepas bacterianas y 4 fúngicas fueron comprobadas. Siendo el extracto de *H. brevipes* el que mostró el efecto más fuerte sobre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos, probablemente por su alto contenido en compuestos fenólicos (Dian-Hong et al., 2013).

El aceite esencial de *H. suaveolens* presentó la mayor cantidad de sesquiterpenos. La especie *H. rhomboidea* se compone en su mayoría de sesquiterpenos y terpenos oxigenados, mientras que el aceite esencial de *H. brevipes* tiene el mayor contenido de compuestos aromáticos (Dian-Hong et al., 2013).

El contenido de terpenos y fenoles en las especies mencionadas coincide con *A. stellulata*. Álvarez-Santos et al. (2022) reportaron actividad antioxidante moderada de un extracto de la misma planta, atribuyéndose a los grupos de metabolitos mencionados. Aún cuando se ha reportado la composición fitoquímica de aceites esenciales en plantas del género *Hyptis*, todavía es poca la información que se tiene acerca de las fracciones extraídas de *A. stellulata*.

Es importante mencionar que el resultado del perfil obtenido es apenas un acercamiento al estudio fitoquímico de *A. stellulata*. Geethika y Sunoj (2017) recomiendan realizar investigaciones, en las que la extracción de metabolitos secundarios se haga con diversos solventes. Además de separar y caracterizar sus componentes químicos para conocer de manera más comprehensiva los productos naturales que ofrecen las especies; ya que la presencia o ausencia de ciertos fitoquímicos está determinada por la polaridad del solvente usado para la extracción y la separación cromatográfica.

Las infecciones son una de las causas principales del retraso en la cicatrización, principalmente en heridas crónicas (Moeini et al., 2020), por lo que el control de las infecciones se vuelve fundamental al tratar una herida y promover su cicatrización. Prevenir y tratar infecciones en heridas de manera tópica resulta conveniente por las siguientes razones: (1) hay una alta concentración del agente activo en la zona que se requiere, (2) producen pocos efectos secundarios a nivel sistémico y (3) genera menor incidencia de resistencia bacteriana (Punjataewakupt et al., 2019).

La actividad antimicrobiana del extracto metanólico (hojas y tallo) de *A. stellulata* no se mostró en las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* evaluadas. Esto es similar al estudio realizado por Ríos et al. (2015), al trabajar con el aceite esencial (hojas y flores) de *H. suaveolens* sobre cepas de *S. aureus*, puesto que no encontraron actividad antibacteriana, incluso a una mayor concentración en los sensidiscos del aceite esencial que estaban evaluando.

Comfort y Johnson (2017) usaron una concentración de 35 mg/mL de diferentes particiones del extracto metanólico (hojas) de *H. suaveolens* y reportaron que no tiene actividad inhibitoria en *S. aureus*. Sin embargo, en ambos estudios (el de Ríos et al., 2015 y el de Comfort y Johnson 2017) el aceite esencial de *H. suaveolens* sí muestra actividad inhibitoria sobre otras bacterias Gram-negativas. Quizás valga la pena explorar la actividad antimicrobiana del extracto de *A. stellulata*, sobre cepas Gram-negativas.

Los resultados de actividad antimicrobiana contrastan con los de Álvarez-Cruz (2022) quien reporta que el extracto metanólico de inflorescencias de *A. stellulata*, cuyo contenido fitoquímico es de fenoles y alcaloides, sí tuvo efecto antibacteriano sobre *S. aureus* cc, una de las cepas evaluadas en este trabajo. Así mismo el extracto metanólico de la parte aérea (hojas y tallos) de la misma especie, que presentó fenoles, cumarinas, flavonoides y glicósidos, tuvo actividad sobre *S. aureus* ATCC 29213, y *S. aureus* FES-C. La diferencia encontrada en este estudio puede deberse a los órganos de la planta de los que se hizo la extracción.

Las concentraciones mínimas inhibitorias a las que los extractos evaluados por Álvarez-Cruz (2022) presentaron actividad antimicrobiana fueron de 1.5 mg/mL del extracto de inflorescencias de *A. stellulata* y de +3 mg/mL del extracto de partes aéreas sobre las cepas cc y FES-C de *S. aureus*, respectivamente; mientras que en este proyecto se usó una concentración de 2 mg/mL en cada disco.

Pedersen (2000) propone que la variación de un compuesto en particular en algunos lugares sigue un patrón impredecible y ello tiene tres posibles explicaciones: (1) hay variación estacional o en las condiciones de crecimiento de un espécimen a otro, (2) hay cambios en el contenido químico relacionados con el manejo del material vegetal previo al almacenamiento y por último (3) hay compuestos que se deterioran debido a un largo periodo de almacenaje.

La actividad antimicrobiana de extractos de especies de la familia Lamiaceae suele atribuirse a la presencia de fenoles y terpenos. Sin embargo, la concentración de este grupo de metabolitos tiene un amplio rango de variación entre géneros dentro de la misma familia (Chia-Jung et al., 2011). Aunque en este estudio se detectaron compuestos fenólicos, es probable que no se encuentren a una concentración suficiente para evidenciar actividad sobre las cepas de bacterias Gram positivas.

Las infecciones en la piel y en superficies mucosas son una de las principales afecciones clínicas atribuidas al género *Candida* de hongos levaduriformes; siendo *C. albicans* la especie con mayor distribución mundial (Potente, 2020). Es por lo que en el campo de la fitoquímica se hacen esfuerzos por encontrar productos naturales cuya actividad biológica permita usarlos en tratamientos antifúngicos. En el presente estudio, el extracto metanólico de *A. stellulata* no mostró actividad inhibitoria en el desarrollo de las cepas de *Candida* sobre las que se evaluó.

El modelo de incisión en tejidos se usa para evaluar actividad cicatrizante *in vivo*, ya que con este ensayo puede determinarse el grado de re-epitelización que se asocia a la velocidad del cierre de la herida, fuerza tensil o de rompimiento de herida, colagenización y neovascularización (Agyare et al., 2016). Los primeros dos parámetros mencionados fueron los determinados en el presente trabajo.

La velocidad de cierre de herida obtenida del extracto metanólico de *A. stellulata* es menor a la reportada por Álvarez-Santos et al. (2022) quien evaluó la misma actividad en ratones CD-1, pero de la cepa sin pelo et/et. Menciona que el 50% de las heridas habían cicatrizado al día 9 del experimento, mientras que en el presente estudio la mayoría de las heridas que se trataron con el extracto metanólico cicatrizaron por completo para el día 13.

La cepa CD-1 et/et es una mutante de ratones desnudos (Basurto-Alcántara et al., 2000). Una posible explicación a las diferencias del tiempo de cicatrización de este estudio con respecto al obtenido por Álvarez-Santos et al. (2022) puede ser la condición de la piel de los sujetos de estudio, así como su edad.

El tiempo en el que cerraron por completo las heridas de los grupos tratados con Recoverón® (C+) y con extracto metanólico de *A. stellulata* coinciden con el proceso normal de cicatrización. Comparándolos con el control negativo, puede notarse que los tratamientos promueven la cicatrización, pues la fase proliferativa suele ocurrir de 1 a 3 semanas después de la herida (Strodtbeck, 2001).

El cierre de la herida está relacionado con la etapa proliferativa del proceso normal de cicatrización, ya que esta fase puede comenzar dentro de las primeras 48 horas luego de la lesión y se extiende hasta el día 14. En esta etapa se dan la angiogénesis, fibroplasia y reepitelización (González et al., 2016). Puesto que los tiempos de cierre de herida en los grupos tratados con Recoverón (C+) y el extracto metanólico de *A. stellulata* son muy similares, es posible que el extracto promueva alguno de los procesos mencionados.

En la tercera etapa de la cicatrización, la proliferativa, comienza a desarrollarse la fuerza de la cicatriz; el proceso puede verse facilitado por un ambiente cálido y húmedo (Strodtbeck, 2001); condiciones aportadas por los tratamientos aplicados en este estudio.

Pastar et al. (2014) dicen que la capacidad regenerativa de la piel se debe a las poblaciones circundantes de células madre de la epidermis; estas células tienen tres nichos conocidos hasta ahora: bultos en los folículos pilosos, la base de las glándulas sebáceas y la capa basal de la epidermis interfolicular.

Los fenoles detectados en el extracto metanólico de *A. stellulata* nos proporcionan una posible explicación a la actividad cicatrizante exhibida en el presente análisis, debido a la naturaleza antioxidante de este grupo de metabolitos. Agyare et al. (2016) mencionan que una mayor cantidad de antioxidantes facilitan el depósito de colágeno en las heridas.

Es decir que se estaría promoviendo el desarrollo de la fase de remodelación, pues es en esta etapa en la que se realiza el depósito de colágeno (Broughton II et al., 2006). Es necesario realizar pruebas de actividad antioxidante del extracto, así como observaciones histológicas para confirmar o descartar esta idea.

En la prueba tensiométrica realizada, la fuerza de tensión necesaria para reabrir la herida registrada en este estudio resultó muy superior a la que reportan Chitra et al. (2009) tanto en el extracto metanólico y el extracto de éter de petróleo de *H. suaveolens*, así como en los controles puestos a prueba (DMF y Estreptomina).

La fuerza de tensión que se requirió para abrir la herida de los ratones tratados con extracto de *A. stellulata* mostró ser mayor en contraste con los tratamientos C+ y C-; lo que sugiere que el extracto podría promover también una buena fase de remodelaje, ya que es en esta etapa en la que la matriz extracelular formada principalmente por fibrina y fibronectina es reemplazada por una matriz más densa de fibras de colágeno (Broughton II et al., 2006).

Conclusiones

El rendimiento del extracto metanólico de los órganos vegetativos aéreos de *A. stellulata* fue del 18.56 %.

Se comprobó la presencia de fenoles, glicósidos, terpenos y esteroides en dicho extracto y coincide con el contenido fitoquímico de al menos cuatro especies del género más cercano y con el de dos antecedentes de la misma especie.

El extracto no mostró actividad antimicrobiana sobre ninguna de las cepas en las que se probó, de acuerdo con el ensayo de difusión en disco.

La velocidad del cierre de la herida aplicando el extracto crudo de *A. stellulata* fue muy similar a la obtenida con el control positivo, por lo que el extracto sí tiene actividad cicatrizante.

A pesar de no haber diferencias significativas en la evaluación tensiométrica, se observó una tendencia al aumento de la fuerza de tensión de las heridas de los ratones tratados con el extracto metanólico de hojas-tallo de *A. stellulata*.

Literatura citada

Agyare, C., Duah, B. Y., Oppong, B. E., Hensel, A., Oteng, D. S. & Appiah, T. 2016. Review: African medicinal Plants with wound healing properties. *J. Ethnopharmacol.* 177, 85-100

Álvarez-Cruz, G. B. 2022. Actividad Antimicrobiana de *Asterohyptis stellulata* (BENTH, 1932). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Álvarez, S. N. 2019. Evaluación de las propiedades antioxidante y cicatrizante de algunas plantas medicinales utilizadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Álvarez-Santos, N., Estrella-Parra, E., Del Carmen Benítez-Flores, J., Serrano-Parrales, R., Villamar-Duque, T. E., Santiago-Santiago, M. A., Del Rosario González-Valle, M., Avila-Acevedo, J. G., & García-Bores, A. M. 2022. *Asterohyptis stellulata*: Phytochemistry and Wound Healing Activity. *Food Biosci.* 50, 102150.

Asghari, G., Akbari, M. and Asadi-Samani, M. 2017. Phytochemical analysis of some plants from Lamiaceae family frequently used in folk medicine in Aligudarz region of Lorestan province. *Marmara Pharm. J.* 21(3), 506-514

Basurto-Alcántara, F.J., Mondragón, V. R. L., Atilano-López, D., Montaraz, C. J. A., Marques, S. M. J., Rosas, S. P. y Marroquín-Segura, R. 2000. Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico et/+ y desnudo et/et. *Vet Mex.* 31(3):209-216.

Broughton II, G., Janis, J.E., y Attinger, C.E. 2006. The Basic Science of Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 117(7S),12-34

Chaudhary, S., Negi, A. y Dahiya, V. 2010. The Study of in-vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants in Chamoli Garhwal Region. *Phcog. J.* 2(12), 481-485

Chia-Jung, L., Lih-Geeng, C., Ting-Lin, C., Wei-Ming, K., Ying-Fei, L. & Ching-Chiung, W. 2011. The correlation between skin-care affects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry.* 124, 833-841

Chitra, S., Patil. M.B., Ravi, K. 2009. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit (Lamiaceae). *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 1, 737-744

Comfort, O. O. & Jhonson, G. H. 2017. Antimicrobial potential of extracts of *Hyptis suaveolens* (L) Poit. leaves on some gram-positive bacterial isolates. *JAMPS* 12(4), 1-11

CONABIO. s.f. *Asterohyptis stellulata* (Bent.) Epling, 1932, válido. Obtenido de (04/10/2019): <http://enciclovida.mx/especies/169572-asterohyptis-stellulata>.

Coy-Barrera, C. A., Parra, J., & Cuca Suárez, L. E. 2014. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Elementos*, 4(4):31-39.

Dian-Hong, X., Ya-Si H., Dong-Qing J. & Ke Y. 2013. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharm. Biol.* 51(9), 1125-1130

Frezza, C., Venditti, A., Serafini, A. & Bianco, A. 2019. Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology, and Nutraceuticals of Lamiaceae. In: *Studies in natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (Ed) Vol. 62 Elsevier: Netherlands. (pp. 125-178)

García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía-UNAM: México.

Geethika, K. P. and Sunoj, K. 2017. Preliminary phytochemical screening of 6 members of *Leucas* Lamiaceae. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 47(1), 60-64

González, A. C., Costa, T. G., Andrade, Z. A. & Medrado, A. R. A. P. 2016. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 91(5):614-20

Guo, S. y DiPietro, L.A. 2010. Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* 89(3), 2019-229

Jacobo-Herrera, N.J., Jacobo-Herrera, F.E., Zentella-Dehesa, A., Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., Pérez-Plascencia, C. 2016. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J. Ethnopharmacol.* 179, 391-402

Jones, S.G., Edwards, R., y Thomas, D.W. 2004. Inflammation and Wound Healing: The Role of Bacteria in the Immune-Regulation of Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 3(4)

Kancherla, N., Dhakshinamoothi, A., Chitra, K. y Komaram, R. B. 2019. Preliminary Analysis of Phytoconstituents and Evaluation of Anthelmintic Property of *Cayratia auriculata* (In Vitro). *Maedica (Bucur)* 14(4):350-356

Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., González-Gallegos, J.G., Lara-Cabrera, S.I., Zamudio, S. 2017. Lamiaceae de México. *Bot. Sci.* 95(4), 780-806

Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Rev. Mex. Biodivers.* 84, 30-86

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. 2003. CHROMATOGRAPHY High-Performance Liquid Chromatography. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd Ed) Caballero, B. (Ed) Academic Press: USA. (pp. 1274-1280)

Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M. y Gomez d. G. 2020 Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* 233

Nath, M. C., Chakravorty, M. K., y Chowdhury, S. R. 1946. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids. *Nature*, 157(3978), 103–104

Ocampo, R., Balick, M. 2009. *Plants of Semillas Sagradas: An Ethnomedicinal Garden in Costa Rica* (R, Goldstein y K, Herrera, Eds.) (First edition). Finca Luna Nueva Extractos de Costa Rica.

Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. 2014. Epithelialization in wound healing: A comprehensive review. *Adv. Wound Care.* 3(7), 445–464

Pedersen, J. A. 2000. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 229-253

Peng-Hui, W., Ben-Shian, H., Huann-Cheng, H., Chang-Ching, Y., Yi-Jen, C. 2018. Wound healing. *J. Chin. Med. Assoc.* 81(2), 94-101

Picking, D., Delgoda, R., Boulogne, I., Mitchell, S. 2013. *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* 147, 16-41

Potente, G., Bonvicini, F., Gentilomi, G. A. y Antognoni, F. 2020. Anti-*Candida* Activity of Essential Oils from Lamiaceae Plants from the Mediterranean Area and the Middle East. *Antibiotics.* 9, 395

Punjataewakupt, A., Napavichayanun, S., Aramwit, P. 2019. The downside of antimicrobial agents for wound healing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38:39–54

Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinamaki, J., Romane, E., Gudiene, V., Jak-tas, V., Koshvyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T. y Nguyen, H. T. 2020. Dragendorff 's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Die Pharmazie* 75: 299-306.

Rathod, Z. R., Shukla, P., Patel, C., Shah, D. y Saraf, M. S. 2022. A Review on Qualitative and Quantitative Analysis of Carbohydrates Extracted from Bacteria. *Acta Sci. Pharm. Sci.* 6.3 (2022): 20-28

Ríos, N., Márquez, X. R., Mendoza, T., Díaz, L., Rojas, J. y Carmona, C. Y. 2015. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* L. (poit) de los llanos venezolanos. *Rev. Peru Biol.*: 22(1), 103 - 107

Sandle, T. 2016. 14 - Antibiotics and preservatives in Pharmaceutical Microbiology Essentials for Assurance and Quality Control. Woodhead Publishing. 171-183

Strodtbeck, F. 2001. Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs. Rev.* 1(1), pp. 43 - 52

Turner, B. L. 2011. Overview of the genus *Asterohyptis* (Lamiaceae) and description of a new species from northern Mexico. *Phytoneuron* 2011-2, 1-6

Wagner, H., y Ulrich-Merzenich, G. 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3):97 - 110