

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PLANTAS
MEDICINALES**

Tesis

**“Evaluación de las actividades antioxidante, ansiolítica y sedante de extractos
de flores de *Theobroma cacao* L. del municipio de Cunduacán Tabasco.”**

Que para obtener el grado de
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

PRESENTA:

Q.A. Coral García Mora

Director: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Codirectora: Dra. Giselle Tamayo Castillo

Cuernavaca Morelos, junio 2026

Esta tesis se realizó en el Posgrado de Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con una beca de estudios de posgrado otorgada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales, bajo la tutoría del Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por abrirme el camino y acompañarme en cada instante.

A mi compañero de vida, Alberto Segovia, tu motivación y apoyo incondicional han hecho posible este posgrado. Gracias por seguirme y alentarme en cada sueño y proyecto que se me ocurren.

Al Dr. Alexandre Cardoso, por darme la oportunidad y la confianza de trabajar en su laboratorio y crecer en mi camino profesional. A la Dra. Giselle Tamayo, por compartir generosamente sus conocimientos, orientación y experiencia, fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Asimismo, agradezco a los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Nahím Salgado, Dr. Fernando Cuevas y Mtra. Mónica Morales, por sus valiosas observaciones y acompañamiento académico, que contribuyeron significativamente al fortalecimiento de esta investigación.

Al abuelo Efrén Maldonado, por permitirme trabajar en las tierras de su sagrado cacao y compartir sus conocimientos conmigo para la realización de esta investigación.

A mis compañeros y amigos, por acompañarme en este camino y permitirme acompañarlos en el suyo, compartiendo conocimientos, conversaciones y risas. En mi andar he aprendido que las amistades no son perfectas, y mucho menos eternas, pero sí necesarias para transitar por el mundo, haciéndonos la vida más ligera y cubriendo las penas con sonrisas. De verdad, ¡gracias por estar!

Y a mi familia, porque, a pesar de la distancia, escuchar sus voces me llena el alma.

Llegué a Cuernavaca hace un par de años con una maleta y muchos miedos, pero también con muchas ilusiones. Hoy no solo celebro haber vencido esos miedos y alcanzado algunas de mis metas; celebro también tenerlos a todos ustedes como amigos y como familia.

Que la vida los siga llenando de amor y cacao.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. <i>Theobroma cacao</i>	2
2.2. <i>Theobroma cacao</i> en México	7
2.3. Metabolitos de <i>Theobroma cacao</i> con aplicaciones terapéuticas	10
2.4. Actividad antioxidante de <i>Theobroma cacao</i> .	11
2.5. Usos etnobotánicos de <i>Theobroma cacao</i> .	12
2.6. Ansiedad	13
2.7. Plantas con actividad ansiolítica	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.2. Objetivo general	17
5.3. Objetivos específicos	17
6. METODOLOGÍA	18
6.2. Desarrollo metodológico	18
6.3. Muestreo y conservación de las muestras	19
6.4. Preparación de extractos	19
6.5. Identificación de perfiles de compuestos	19
6.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	20
6.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	20
6.6. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH	21
6.7. Determinación de la actividad ansiolítica y sedante	21
6.6.1 Prueba del laberinto en cruz elevada (LCE)	22
6.6.2. Prueba de potenciación del tiempo de sueño	22
7. RESULTADOS	23
7.2. Rendimiento de los extractos vegetales	23
7.2. Obtención de los perfiles cromatográficos por medio del análisis de cromatografía en capa fina (CCF)	24
7.3. Identificación y cuantificación de metilxantinas en los extractos por medio de CLAE	32
7.4. Evaluación de la actividad antioxidante	38
7.5. Evaluación de la actividad ansiolítica y sedante	41
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS	45
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
11. ANEXOS	53

1. INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo de importancia mundial debido a su alta demanda. México tiene la fortuna de ser el catorceavo productor de cacao en el mundo (Ganem 2022). Las variedades de cacao que predominan en nuestro país son criollos y trinitarios. La mayoría de las fincas cacaoteras de México llevan a cabo prácticas agrícolas sustentables en cultivos multivarietales, regularmente son libres de pesticidas, por lo cual el valor comercial y la calidad del producto obtenido de estos cultivares son mayores.

En México la floración de los árboles de cacao es durante todo el año, siendo la temporada de verano y otoño las de mayor floración. Un árbol de cacao produce aproximadamente 6000 flores por año, de las cuales un máximo de 5% son polinizadas y producen frutos, siendo que el 60% de las flores se cae si pasan 48 horas sin ser polinizadas (Dostert et al., 2012).

Desde las antiguas civilizaciones se sabe que las diferentes partes del árbol de cacao poseen múltiples propiedades benéficas para la salud, lo cual se ha estudiado y confirmado científicamente en los últimos años. Según el código Badiano (1590), algunas culturas antiguas de América atribuían a la flor de cacao (como componente de baño, infusión o aplicación directa) la capacidad de aliviar la fatiga, proveer calma y aliviar el dolor de muelas (Dillinger et al. 2000). Basado en lo anterior, en el presente proyecto se plantea la posibilidad de identificar grupos de compuestos fitoquímicos con actividad farmacológica relevante, como las metilxantinas, además de evaluar las actividades antioxidante, ansiolítica y sedante del extracto etanólico, de las flores de *Theobroma cacao* L. Estas son utilizadas por la comunidad de Yoloxochitl, Cunduacán Tabasco, México como tranquilizantes, además de que en su gran mayoría estas flores terminan en el suelo formado parte de la materia orgánica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Theobroma cacao*

De la familia Malvaceae y subfamilia Sterculioideae se desprende el género *Theobroma*, el cual está integrado por 22 especies, todas ellas originarias de centro y Sudamérica (Cuatrecasas, 1964). La especie de *Theobroma* con mayor impacto económico a nivel mundial es *Theobroma cacao* L, comúnmente conocido como árbol de cacao o cacaotero.

El cacao (fig.1) se divide en tres grupos botánicos: criollo, forastero y trinitario, siendo que este último se originó a partir de la cruce de las semillas criollas y forasteras. Actualmente, la gran mayoría de las especies de cacao se desprenden de esta hibridación, por lo que hay una gran variabilidad de subespecies. En general los frutos de cacaos trinitarios son polimórficos, robustos y los más conocidos han sido comúnmente denominados como cacao Cundeamor, Angoleta y Calabacillo (Romero, 2016); sus semillas son de color violeta claro a oscuro. Esta variedad representa del 10-15% de la producción mundial (Dostert et al., 2012) y puede ser considerada de fino aroma.

La gran variabilidad de cruces entre cacaos que existen actualmente hace que sea difícil identificarlos estrictamente como parte de las dos subespecies principales de cacao que fueron caracterizadas hace algunas décadas (Motamayor et al., 2002). La primera, *Theobroma cacao* L. subsp. *cacao* o cacao criollo, es representada por árboles delgados con frutos alargados y puntiagudos y coloración verde rojiza; los frutos de cacao criollos son de bajo rendimiento, susceptibles a enfermedades, pero con gran potencial de sabores, aromas finos y pronunciados con los que se pueden obtener productos de alta calidad (Romero, 2016). El cultivo comercial de este tipo de cacaos es en países como Venezuela, Colombia, Ecuador y México, donde se han identificado algunas especies criollas antiguas (Araque, 2012). La segunda, *Theobroma cacao* L. subsp. *sphaelocarpum* o cacao forastero, son árboles robustos y grandes con hojas pequeñas, corteza del fruto gruesa, con granos de color violeta oscuro o púrpura, tienen mayor tolerancia a enfermedades y plagas; su cultivo principal se da en Brasil y África occidental; es el cacao de mayor producción en el mundo, más del 70% de la producción de cacao se da a partir de cacao forastero (Romero, 2016; Dostert et al., 2012).

De manera general, morfológicamente el *T. cacao* L. es un árbol de talla pequeña, entre cuatro y siete metros de altura, aproximadamente; es hermafrodita, angiosperma, dicotiledónea y perennifolio (Ballesteros 2011). La copa del árbol de cacao es baja, densa y extendida, sus hojas son coriáceas simples, enteras y elípticas de punta larga y de margen liso (Dostert et al., 2012). El tronco del cacao es dimórfico, con bordes ortitrópicos comúnmente “llamados chupones” y sus ramas suelen ser plagiotrópicas o en abanico. La corteza externa regularmente es agrietada, áspera y delgada de color castaño oscuro (Ballesteros, 2011).

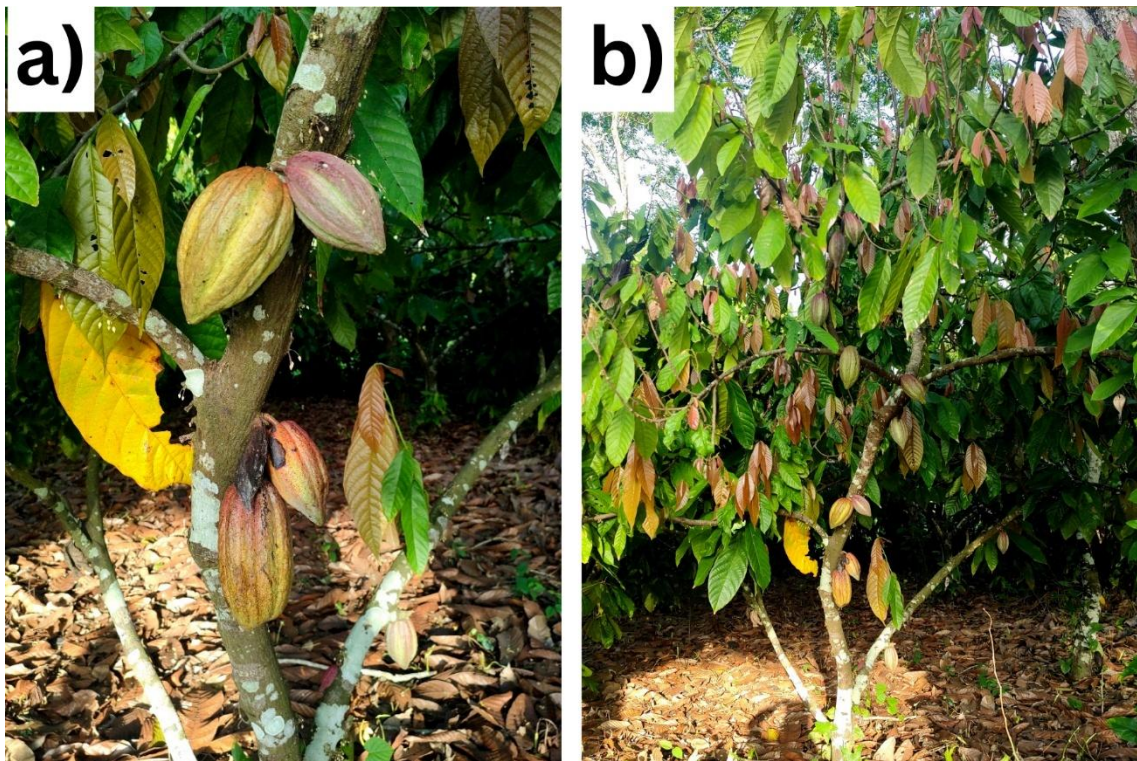


Figura 1. Árbol de *Theobroma cacao* L. en etapa productiva. a) Frutos en diferentes estados de madurez creciendo directamente en el tronco. b) Vista general del árbol de cacao con follaje y frutos en el tallo principal y ramas (fotografía de autoría propia).

Los frutos del cacao (fig. 2) son bayas o mazorcas grandes, carnosas, ovaladas, pueden ser amarillas, rojas, naranjas o verdes dependiendo de la especie y tiempo de maduración. Miden de 15 a 30 cm de largo, aproximadamente, y 10 centímetros de grueso, son regularmente puntiagudas y con camellones longitudinales (Dostert et al., 2012). Sus características varían dependiendo del grupo botánico al que pertenezcan (Romero, 2016). El exocarpio está formado por tejido esponjoso, el mesocarpio es semileñoso y el endocarpio es carnosos y suave (Dostert et al., 2012). Cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial, e incrustadas en una masa de pulpa (mucílago) desarrollada de las capas externas de la testa (Ballesteros, 2011).

Por su parte las semillas (fig. 3) son relativamente grandes, aproximadamente entre 1-2 cm de largo, dependiendo de la especie y tiempo de maduración, son color marrón, púrpureo o blanco y de sabor amargo. No tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor agridulce. El interior está prácticamente ocupado por los dos cotiledones del embrión; comúnmente se les llama "granos" de cacao. Son ricos en almidón, proteínas y grasas, de ahí su valor nutritivo (Ballesteros, 2011). Al igual que con los frutos, el color y la forma de las semillas varía entre cada grupo botánico (Romero, 2016).

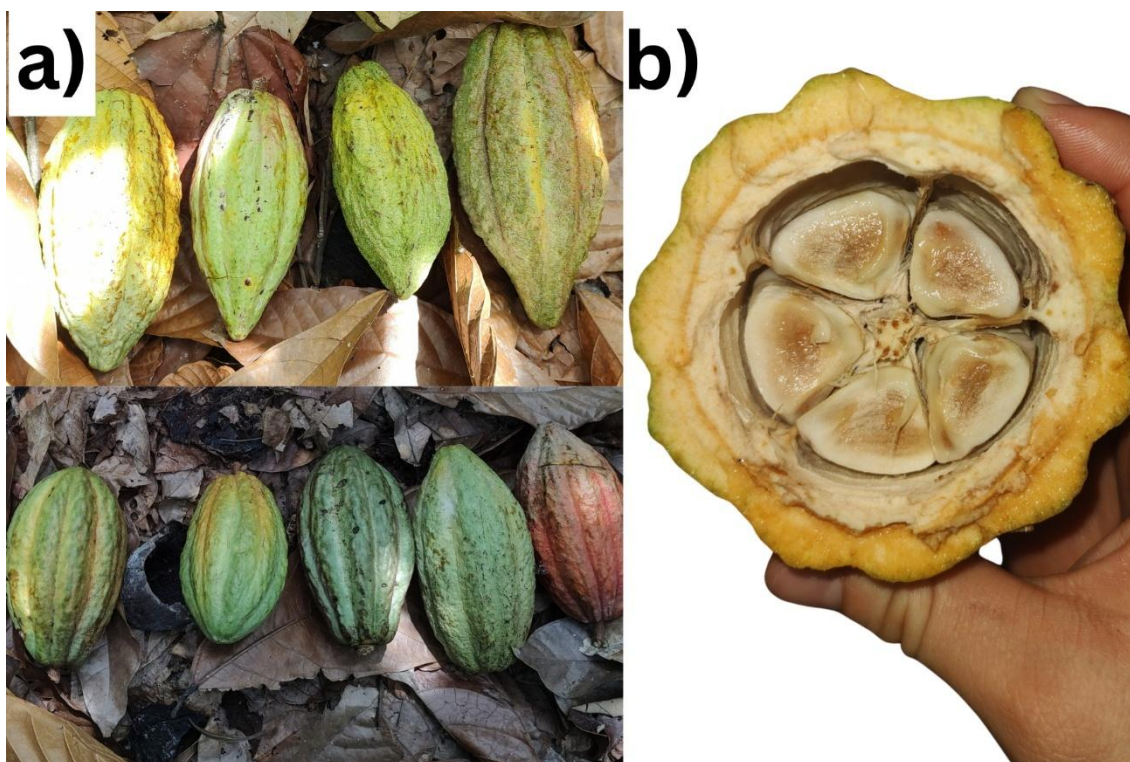


Figura 2. Diversidad de mazorcas de *Theobroma cacao* y estructura interna del fruto.
a) Variaciones naturales de mazorcas de *Theobroma cacao* recién recolectadas. b) Corte transversal de mazorca de *Theobroma cacao* (fotografía de autoría propia).

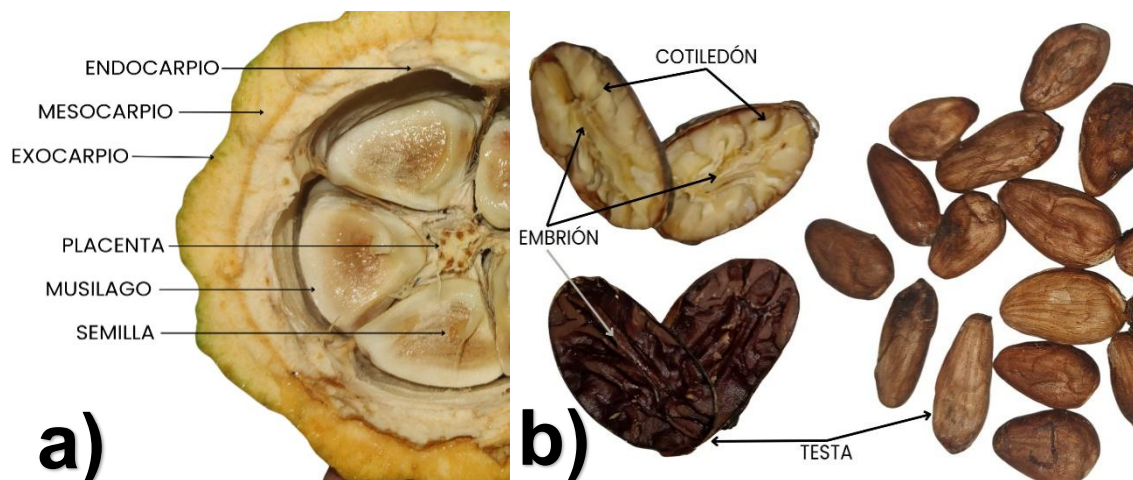


Figura 3. Estructura anatómica del fruto y semillas de *Theobroma cacao* a) Estructura anatómica del fruto de *Theobroma cacao*. b) Estructura anatómica de la semilla de *Theobroma cacao* (fotografía de autoría propia).

Aproximadamente, a partir de los 3 años de vida del árbol se empiezan a producir “cojines florales”. El árbol florece durante casi todo el año, pero la producción de flores se acentúa durante la temporada de lluvias, que, en las principales zonas productoras de México, incluyendo Tabasco, comprende los meses de junio a octubre (INEGI, 2022). Este patrón responde a la disponibilidad

hídrica como principal factor regulador de la fenología floral de la especie, independientemente de la estación del año, ya que en otras regiones productoras del mundo la floración ocurre en temporadas distintas según su régimen de precipitación local. Por ejemplo, en Ghana la floración del cacao ocurre durante su temporada de lluvias principal, de junio a agosto (Adjaloo et al., 2012), mientras que en regiones con distribución bimodal de lluvias como Costa de Marfil se presentan dos picos de floración por año, y en zonas con régimen monzónico como Indonesia los picos de floración se desplazan hacia los meses de octubre a marzo (Carr & Lockwood, 2011).

Las flores del *T. cacao* (fig. 4) son caulifloras, es decir, que se desarrollan en racimos sobre el tronco y las ramas. Se sostienen por un pedicelo de 1 a 3 cm, son flores pentámeras, hermafroditas y actinomorfas (Dostert et al., 2012). Tienen forma de estrella, con 5 pétalos largos, pueden ser de color rosa, púrpura o blanca que miden aproximadamente 6.0 mm de largo; los sépalos (también 5) están alternados con los pétalos y su forma es muy parecida, son angostos, puntiagudos y ampliamente extendidos. El cáliz es de color rosa con segmentos puntiagudos. Cada flor mide alrededor de 1-2 cm de diámetro, 2-2.5 cm de largo (Ballesteros, 2011). Se abren durante las tardes y pueden ser fecundadas durante todo el día siguiente. Los estambres son 10 y lineares: cinco estambres fértiles se alternan con cinco estaminodios. Todos los estambres están fusionados en la base formando un tubo. Los estambres fértiles son de 2.5 a 3 mm de largo y están dispuestos frente a los pétalos; los estaminodios son violeta y 6.5 a 7.5 mm de largo.



Figura 4. Estructura anatómica de flores de *Theobroma cacao* (fotografía de autoría propia).

El ovario es de 2 a 3 mm de largo, anguloso ovado, ligeramente pentagonal y pentámero. Los óvulos se disponen en dos filas con 6, 12 o 16 óvulos por fila (Dostert et al., 2012). La polinización de estas flores es entomófila, siendo que la mosquita de la subfamilia Ceratopogonidea y subgénero *Forcipomya* es considerada el principal polinizador de *T. cacao* (Chumacero de Schawe et al., 2018).

Los estudios científicos en torno a las flores de cacao se han enfocado en determinar su morfología y los factores que influyen en su capacidad de atracción de polinizadores, así como la influencia de los diferentes polinizadores en los niveles de rendimiento en la producción de los frutos. En un estudio Ha et al. (2016) examinaron las flores de 63 tipos diferentes de cacao introducidos en Vietnam y demostraron que la diversidad morfológica de las flores incluye variaciones entre sus formas ovaladas, anchas, elípticas, deltoides y lanceoladas. De igual manera identificaron que los colores de los estaminodios y los estambres van del rosa claro al púrpura y que no había variación entre las formas de los granos de polen de las flores estudiadas.

Con la finalidad de identificar los compuestos volátiles y aromáticos dentro de las flores de cacao que atraen a los mosquitos polinizadores, Erickson et al. (1987) encontraron 78 compuestos volátiles presentes en extractos oleosos de flores de *T. cacao* cultivadas en Costa Rica por medio de cromatografía de gases. Arnold et al. (2019) analizaron muestras de flores de cacaos en Jamaica y Trinidad y Tobago por medio de un sistema de captura de compuestos volátiles. En este estudio se identificaron compuestos aromáticos como hidrocarburos de cadena lineal, saturados e insaturados tales como tridecano, pentadecano, (Z)-7-pentadeceno y (Z)-8-heptadeceno con un heptadecadieno y heptadecatrieno como componentes minoritarios.

Young et al. (1994) también estudiaron las moléculas de extractos orgánicos concentrados de flores de cacao de diferentes procedencias para relacionarlos con las especies de polinizadores presentes en cada cultivar. En este estudio resaltó una especie de cacao criollo mexicano, que a diferencia de ejemplares de otras partes del mundo atraía a más de una especie polinizadora, así como a algunas avispas. Del extracto resultante de las flores de este cultivar se obtuvieron moléculas volátiles de mayor peso molecular. En este último estudio los compuestos con mayor presencia en los extractos oleosos de las flores fueron el n-pentadeceno y n-pentadecano. Derivado de estas investigaciones se sabe que la cantidad de flores que llega a convertirse en frutos es mínima y por ello hay una cantidad considerable de flores (incluso polinizadas) que pueden ser aprovechadas para otros usos.

Las semillas de cacao han sido ampliamente estudiadas en cuanto a su composición nutricional. Los lípidos constituyen el componente mayoritario, con valores que oscilan entre 48 y 60%, seguidos de los carbohidratos con aproximadamente 9% y las proteínas alrededor del 13%. Los ácidos grasos se organizan principalmente en forma de triacilgliceroles, siendo el oleico (31–35 g/100 g), el esteárico (33–35 g/100 g), el palmítico (25–28 g/100 g) y el linoleico (2–3.5 g/100 g) los más representativos (Fideles et al., 2023). La estructura de estos ácidos grasos incide directamente en las características de los productos obtenidos del cacao,

incluyendo textura, viscosidad y sabor (Melo et al., 2020). Adicionalmente, la semilla de cacao representa una fuente significativa de minerales esenciales para la dieta humana, entre los que destacan el fósforo, el magnesio, el cobre, el potasio y el calcio (Fideles et al., 2023).

Cabe señalar que el contenido y perfil de ácidos grasos varía en función de la variedad del grano y las condiciones de cultivo (Cerri et al., 2019; Melo et al., 2020). En la semilla, el ácido esteárico y el ácido oleico son los más abundantes, siendo el oleico el principal ácido graso insaturado y el esteárico el saturado predominante (Cerri et al., 2019). Además, parte importante de la composición del cacao, y por la cual se le atribuyen tantos beneficios a la salud, es por las altas y variadas concentraciones de polifenoles como los flavonoides que contiene (Hii et al., 2009).

Además de su valor nutricional, las semillas de cacao contienen compuestos bioactivos de notable interés farmacológico. Entre ellos destacan las metilxantinas: la teobromina, la cafeína y la teofilina (Fideles et al., 2023). La teobromina se encuentra en concentraciones superiores a las de la cafeína en el cacao y, junto a esta última, es responsable en buena medida del atractivo sensorial del alimento, al influir positivamente en el estado de ánimo y el nivel de alerta del consumidor (Martínez-Pinilla et al., 2015). Los principales mecanismos de acción de ambas metilxantinas involucran el bloqueo de receptores de adenosina y la inhibición de fosfodiesterasas, aunque la teobromina exhibe efectos psicoactivos cualitativamente distintos a los de la cafeína y presenta una vida media plasmática más prolongada, lo que podría explicar varios de los beneficios atribuidos al consumo de cacao (Martínez-Pinilla et al., 2015).

Entre los compuestos no volátiles que conforman la matriz de cacao y actúan como precursores del sabor se encuentran las procianidinas, proteínas de reserva, azúcares reductores (fructosa y glucosa) y aminoácidos hidrofóbicos libres como leucina, fenilalanina, valina, alanina e isoleucina (Giacometti et al., 2015; Aprotosoie et al., 2016). En procesos de postcosecha como la fermentación y el secado, estos precursores experimentan transformaciones enzimáticas que establecen el potencial aromático del grano. Posteriormente, durante el proceso de transformación del cacao se desarrollan reacciones como la de Maillard y la degradación de Strecker durante el tostado y se producen más de 600 compuestos volátiles que definen el sabor característico, entre los que destacan pirazinas, aldehídos, furanos, ácidos orgánicos y terpenoides, estos últimos también presentes de forma natural en el grano crudo, con concentraciones que varían según el cultivar (Aprotosoie et al., 2016).

2.2. *Theobroma cacao* en México

La importancia del cacao en América data desde la época de los Mayas en América Central hace más de 1500 años y hasta el día de hoy, y está directamente relacionado con la cultura, tradiciones y forma parte de la alimentación, así como de la economía de varios países latinoamericanos. En América Latina y el Caribe

aproximadamente 350,000 familias están dedicadas al cultivo del cacao, de las cuales 40,000 son familias mexicanas. En el año 2020 la producción de cacao fue de 28,105 toneladas en aproximadamente 60,000 hectáreas distribuidas entre los principales estados productores de México (INIFAP, 2021).

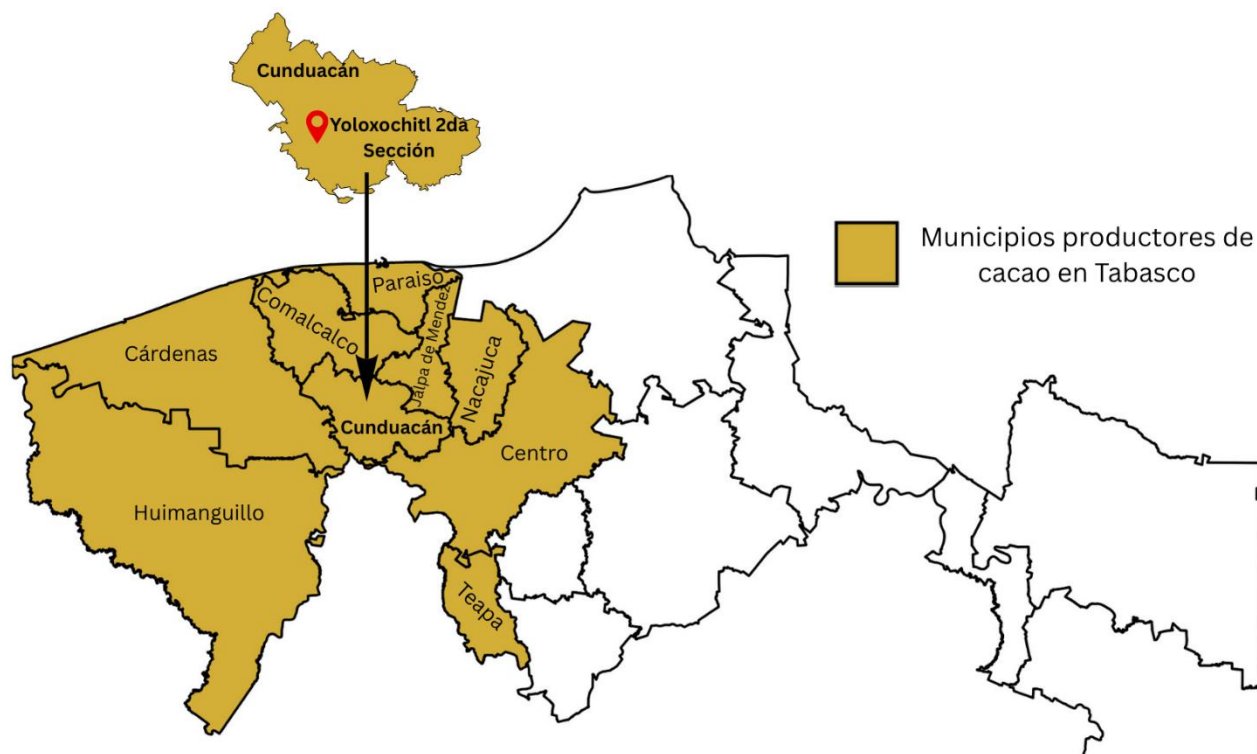
El cacao crece bajo las zonas de bosques tropicales lluviosos. En México el estado de Tabasco es el principal productor, ya que el 69% de cacao cultivado pertenece a este estado del país, seguido por Chiapas con el 30% y Guerrero con el 1% (SIAP, 2021). Sin embargo, de manera extraoficial se sabe que existen pequeñas plantaciones de cacao en estados como Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo y Michoacán (fig. 5).



Figura 5. Estados productores de cacao en México

Tabasco se localiza en la zona sureste de México, cuenta con 17 municipios, la mayoría de ellos productores de cacao, lo cual es posible dadas las condiciones geográficas y climatológicas de esta zona. Se localiza entre las coordenadas 17° 15' y 18° 39' de latitud norte y 91° 00' y 94° 07' de longitud oeste (INEGI, 2022), lo que lo sitúa dentro de la zona intertropical, región caracterizada por recibir radiación solar de alta intensidad durante todo el año, su clima es tropical húmedo, las temperaturas a lo largo del año van de 15 a 42°C, siendo 27°C el promedio, cuenta con elevaciones de máximo 42 msnm en los principales municipios productores, precipitaciones anuales de 1500 a 2500 mm y posee con suficiente accesibilidad al agua dada por sus ríos principales, el Usumacinta y el Grijalva (INEGI 2022). Cabe destacar que los cultivos de cacao en México son parte de sistemas agroforestales multidiversos, lo

cual se ha demostrado en diferentes estudios. Por ejemplo, Ramírez-Meneses et al. (2013) identificaron tan solo dentro de 6 parcelas cacaoteras del municipio de Cárdenas Tabasco de entre 30 y 50 años, más de 24 familias florísticas, 40 géneros y más de 40 especies. Por lo tanto, estos sistemas proporcionan las condiciones ideales para tener zonas de cultivo sanas, tendientes a lo sustentable y ricas en biodiversidad. En el estado de Tabasco los municipios donde más se cultiva cacao son: Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo, Paraíso, Jalpa, Nacajuca, Centro y Teapa (Tadeo-Sánchez, & Tolentino-Martínez, 2020), siendo el municipio de Cunduacán nuestra zona de recolección de muestras, específicamente en los



cacaotales aledaños a la zona de Yoloxochitl segunda sección (fig. 6).

Figura 6. Principales municipios productores de cacao en Tabasco, México.

Las variedades de cacao que se producen en estas regiones son el trinitario y criollo, cuyas propiedades sensoriales los caracterizan por ser las especies de mayor calidad para la industria de la chocolatería fina. Los productores y transformadores artesanales de cacao en México tienen como objetivo mejorar y equilibrar la cadena de valor de sus productos, resaltando la calidad e historia que posee el país con relación a esta especie, mediante el empoderamiento y desarrollo de las unidades de producción familiar, así como la sensibilización social acerca del valor ambiental, nutracéutico, etnomédico y sensorial que poseen las especies de cacao cultivadas en México.

2.3. Metabolitos de *Theobroma cacao* con aplicaciones terapéuticas

Algunos de las aplicaciones terapéuticas de las moléculas que conforman a las semillas de cacao fueron recopiladas por Ballinas y López (2016). Entre ellas se encuentran la teobromina y la teofilina; la teofilina es empleada como diurético, estimulante cardíaco, vasodilatador y relajante muscular, siendo que su efecto en el sistema nervioso es menor que el de la cafeína. Por otro lado, la teofilina se ha utilizado en tratamientos de asma; se sabe que estimula el sistema nervioso central y aumenta el flujo renal. La anandamina, una amina lipídica, causa sensaciones relajantes, incluso llega a inducir el sueño; actualmente se realizan estudios sobre sus efectos anticancerígenos en células cutáneas y cáncer de pecho.

En el caso de la feniletilamina, diversos estudios han demostrado que esta ejerce efectos sobre el estado anímico y tiene una importante acción antidepresiva. De igual manera a partir de las semillas de cacao se ha aislado beta-sitosterol. Este terpeno tiene estructura similar con el colesterol, pero se diferencia por un grupo etilo en C-24 de la cadena; por ello, este compuesto puede inhibir la absorción de colesterol en el cuerpo y reducir los niveles de él en el plasma sanguíneo, ayuda en la regulación de las funciones hepáticas y a la prevención de enfermedades cardiovasculares. El estigmasterol también se encuentra presente y entre las propiedades farmacológicas de esta molécula se reporta la reducción de la absorción de colesterol en el intestino, prevención de algunos tipos de cáncer y contribución a los procesos antiinflamatorios. Actualmente se formulan alimentos con fitoesteroles con la intención de disminuir el colesterol entre la población (Ballinas & López, 2016).

Entre los polifenoles de mayor concentración presentes en el cacao se encuentran los derivados de flavonoides, que son moléculas benéficas para el organismo, ya que tienen la capacidad de prevenir el cáncer, enfermedades cardiovasculares, el deterioro celular y también inhiben la muerte neuronal por apoptosis inducida por neurotóxicos. Otro grupo de metabolitos son las procianidinas, que se han identificado en las semillas de cacao mediante técnicas de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y espectrometría de masas y se han encontrado diversas procianidinas como la B1, B2, B3, B4, B5, C1 y D. El efecto de estas sustancias es de interés por su potente actividad biológica, capacidad antioxidante y reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como de la formación de coágulos (Ballinas & López, 2016).

Los flavanoles presentes en las semillas de cacao, como la epicatequina, también han sido ampliamente estudiados. Se sabe de su efecto cardioprotector, neuromodulador y neuroprotector; se han probado los beneficios de estas moléculas en el sistema cognitivo tras su administración por vía oral en ratones (Van Praag et al., 2007). En este sentido, un estudio clínico realizado por Pase et al. (2013) demostró que, tras la ingesta de una bebida de cacao adicionada con una concentración controlada de polifenoles, los individuos de estudio mejoraron su estado de ánimo

después de treinta días de ingesta. Incluso Sathyapalan et al. (2010) demostraron que la ingesta de chocolate (el principal subproducto de las semillas de cacao) con altas concentraciones de polifenoles pudo mejorar los síntomas relacionados con fatiga crónica. A pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado en esta línea los resultados no son concluyentes, por lo que los efectos de los polifenoles derivados de *Theobroma cacao* se tienen que seguir investigando (Sokolov et al., 2013).

2.4. Actividad antioxidante de *Theobroma cacao*.

Un antioxidante es una molécula que en una concentración mínima tiene la capacidad de retrasar, prevenir o eliminar el daño oxidativo de otra molécula (Nimse & Pal, 2015). Su mecanismo de acción se basa en donar electrones o átomos de hidrógenos, o en quelar iones metálicos promotores de radicales libres (Galano et al., 2016). Estos son necesarios para prevenir la formación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las cuales causan daños en las moléculas de DNA, proteínas y lípidos de un organismo vivo (Halliwell 1996).

La naturaleza de los compuestos con actividad antioxidante es diversa. Para los seres vivos estos pueden ser endógenos como las enzimas glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa o exógenos como las vitaminas o polifenoles (Nimse & Pal, 2015).

Las plantas y los alimentos son fuentes ricas y diversas de antioxidantes. De estos se han identificado compuestos con un alto potencial antioxidante, por ejemplo, vitaminas como la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), carotenoides (β -caroteno, luteína y zeaxantina), minerales cofactores antioxidantes (selenio y manganeso) y un amplio grupo de compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides (flavanoles, flavonas, flavonoles, flavonones, antocianinas, isoflavonas, catequinas e isocatequinas), ácidos fenólicos y taninos (Borns, 1990; Temple, 2000).

En general los flavonoides son compuestos ampliamente estudiados, se conocen más de 4000 moléculas diferentes, así como su interacción con el metabolismo y relación con otras estructuras químicas de muchos de ellos (Bravo, 1998). Se sabe que poseen múltiples actividades biológicas además de su potencial antioxidante. En diferentes estudios se ha vinculado la capacidad antioxidante de los flavonoides con efectos cardioprotectores, ya que estos han demostrado inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), (Heim et al., 2002; Osakabe., 2001). Además, se han relacionado con efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos, antialérgicos, antivirales e incluso como moduladores de la microbiota intestinal en ratones (Hayden et al., 2025; Rice-Evans et al., 1996).

En el caso específico de la planta del cacao, los antioxidantes se han encontrado en las hojas, cáscara del fruto, testa, raíces y por supuesto en los cotiledones o semillas, las cuales han sido ampliamente estudiados (Baharum et al., 2014; Cañas et al., 2023; Sotelo et al., 2015).

El cacao es considerado como uno de los alimentos con mayor concentración de polifenoles, específicamente flavonoides. Los principales compuestos antioxidantes obtenidos de *T. cacao* son compuestos fenólicos como epicatequina, catequina, sus oligómeros procianidínicos (procianidina B y C) antocianinas, ácidos fenólicos, flavonas/flavanonas (quercetina, luteolina, apigenina, naringenina) e incluso clovamide (Carrillo et al., 2014; Hatanno et al., 2002; Kim & Keeney, 1984; Osakabe et al., 1998; Sanbongi, 1998).

Además, Azam et al. (2003) demostraron que las xantinas cafeína, teobromina y teofilina presentes en el cacao poseen capacidad antioxidante en modelos *in vitro*. Asimismo, se ha demostrado que estos compuestos tienen otras actividades biológicas como antiinflamatorios y antitumorales (Cadona et al., 2022).

2.5. Usos etnobotánicos de *Theobroma cacao*.

México es uno de los países privilegiados en cuanto a biodiversidad y sus pueblos han utilizado a lo largo de la historia productos naturales con fines terapéuticos, explotando algunas especies de manera empírica y obteniendo resultados positivos en su aplicación. El estudio científico de plantas se ha basado en estos conocimientos obtenidos con la finalidad de conocer y obtener los metabolitos secundarios con actividad terapéutica; esto es de gran importancia dada la creciente necesidad de desarrollar fármacos nuevos y más específicos para las enfermedades ya existentes e incluso para las nuevas (Cruz et al., 2021; Martínez-Hernández et al., 2022;). La información etnomédica obtenida de las regiones productoras de cacao puede ser una referencia importante para estudios científicos prometedores.

El cacao es alimento, medicina y sustento para las personas de las regiones en donde se cultiva. A partir de las semillas han existido preparaciones culinarias y rituales que se han rastreado histórica y arqueológicamente. Desde las épocas prehispánicas el cacao ha tenido usos medicinales, sobre todo al ser combinado con otras especies. Los padecimientos más relevantes tratados a partir del cacao eran los relacionados con la nutrición, estados de ánimo, falta de energía, problemas intestinales, renales e incluso males relacionados con el sistema respiratorio (Dillinger et al., 2000). Estos conocimientos fueron tan acertados que incluso después de la conquista, en Europa se adoptaron algunos de estos usos terapéuticos (Pucciarelli y Grivetti, 2008). En diversas investigaciones se ha demostrado que las semillas de cacao, así como los productos que de estas se derivan, tienen beneficios para la salud, debido a la gran variedad de componentes químicos propios de los granos y los que se tienden a desarrollar después del proceso de fermentación.

En el caso de las flores de cacao las aplicaciones terapéuticas que se han identificado en los pueblos de América son principalmente como estimulantes y analgésicas, sin mencionar que también se dice que cura la “apatía”, la cual medicamento está relacionada con padecimientos psiquiátricos y depresivos. Se sabe que las flores de cacao eran utilizadas como flores de baño e infusiones para disminuir el cansancio mental (Dillinger et al., 2000). En la actualidad los médicos tradicionales

del Consejo Indígena del estado de Tabasco, pertenecientes en su mayoría a comunidades mayas chontales, siguen utilizando diferentes partes del árbol de cacao, incluida la flor, como medicina tradicional. Según información obtenida mediante entrevista con Efrén Hernández Maldonado, quien es médico tradicional del pueblo Maya Yokot'an en Miahuatlán, Tabasco, (comunicación personal, 2024), “la infusión de flores sometidas previamente a un ritual específico, en donde se utilizan 52 flores de cacao criollo cortadas con cuarzo, aumenta la fertilidad en mujeres y ayuda a combatir los síntomas de preeclampsia y depresión postparto”. De igual manera, estos grupos de médicos tradicionales utilizan tinturas (extractos líquidos) e infusiones ritualizadas de flores de cacao como relajantes y ansiolíticos. Sin embargo, no se han publicado estudios relevantes a cerca de las posibles propiedades bioactivas de los productos fitoquímicos de flores de *T. cacao* que sustenten lo anterior.

2.6. Ansiedad

La ansiedad se define como un estado emocional displacentero que alerta al organismo ante sucesos que lo pueden poner en algún nivel de desventaja, provocando respuestas autónomas motoras y endócrinas. Patológicamente la ansiedad se caracteriza por la relativa autonomía sin causa externa o interna aparente de un cuadro clínico de hiperalerta mediado por el sistema nervioso simpático con una intensidad y duración significativa (Reus, 2022). Las sensaciones que emanan de la ansiedad son: nerviosismo, temor, ataques de pánico, taquicardias, dificultades para respirar, sudoración, diarrea entre otras; a su vez, la ansiedad crónica induce al desarrollo o empeoramiento de condiciones médicas como enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, dolor, migrañas e incluso cáncer (Reus, 2022).

Las investigaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO) indican que los problemas de salud mental en mundo se han incrementado considerablemente a partir de la pandemia por COVID-19. Por ejemplo, se estima que los trastornos depresivos aumentaron 27% y los trastornos de ansiedad 26%; los países con mayores aumentos en estos trastornos fueron en general los que tuvieron mayor afectación por la pandemia, de igual manera se sabe que la población con mayor impacto fue la femenina (WHO 2022). En Estado Unidos los desórdenes de ansiedad afectan aproximadamente al 34% de sus habitantes, un gran porcentaje de estos vive con ansiedad sin tratamiento médico, ya que este solo se recomienda cuando los síntomas son crónicos y afectan aspectos de la vida social, laboral y personal (Szuhany & Simon, 2022). Específicamente en México el INEGI (2021) informó que el 15.4% de los mexicanos están deprimidos y el 31% de la población tiene algún tipo de ansiedad. Estas cifras advierten la necesidad de un aumento en el enfoque hacia el desarrollo de tratamientos y prevención de la salud mental en la población mexicana.

Los fármacos ansiolíticos y sedantes forman parte una gran variedad de compuestos cuya acción principal es inhibir las funciones del sistema nervioso central (SNC), (Katzung & Trevor, 2022). El neurotransmisor más importante en los mamíferos, que inhibe el SNC, es conocido como GABA (ácido gamma

aminobutírico), cuya acción se da cuando este interacciona con el receptor GABA_A. El receptor GABA_A está constituido principalmente por proteínas pentaméricas compuestas por subunidades y está localizado en las membranas de neuronas ubicadas en la amígdala, hipocampo, hipotálamo, corteza prefrontal, entre otras (Galletero et al., 1989; Stepherson, 1995). Este receptor regula la acción del neurotransmisor GABA constituye el principal sitio de acción de numerosos fármacos ansiolíticos y sus análogos, muchos de los cuales son grupos de compuestos naturales aislados e identificados a partir de plantas. Hartley et al. (2022) menciona ejemplos de estos compuestos como la asarona y α -asarona presentes en *Acorus gramineus* o el linalool presente en *Lavandula*. Igualmente, el compuesto aristol-1(10)-en-9-ol presente en *Nardostachys chinensis* y los compuestos terpénicos isopulegol, pinocarveol, verbenol y mirtenol, obtenidos de extractos de especies del género *Sideritis*, un grupo de plantas tradicionalmente empleadas en infusiones con propiedades sedantes demostraron modular significativamente la función del receptor GABA_A (Tsuchiya, 2017).

Los modelos murinos han sido ampliamente utilizados para la evaluación de fármacos en humanos debido a las regiones cerebrales genéticas altamente conservadas entre humanos y ratones. Algunos de los ensayos de este tipo más comunes para determinar la actividad ansiolítica y sedante de fármacos, así como compuestos puros y otros extractos vegetales son el modelo del laberinto de la cruz elevada (LCE) y la prueba de tiempo de sueño, respectivamente (Cruz et al., 1994).

El modelo de LCE se basa en la evaluación del comportamiento exploratorio y evitativo de los ratones dentro de los brazos abiertos y cerrados de la cruz. Estos animales de manera natural prefieren recorrer las zonas de los brazos cerrados que perciben como más seguros, por lo tanto, evitan permanecer en los espacios que representen un riesgo para ellos, es decir, los brazos abiertos. Bajo este modelo de estudio, se ha demostrado que los ratones que son suministrados con fármacos ansiolíticos tienden a pasar más tiempo en los brazos abiertos. Bajo la evaluación de dichos comportamientos se designa o descarta el efecto de las sustancias suministradas como potenciales ansiolíticos (Belzung & Griebel, 2001; Llamasares-Castillo et al., 2025).

Las pruebas para la evaluación del potencial sedante de compuestos y extractos vegetales se realizan ampliamente mediante la inducción del sueño con barbitúricos, en las cuales las sustancias con actividad sedante incrementan significativamente la duración del sueño inducido. Por su parte, la prueba de tiempo de sueño es un ensayo conductual que permite evaluar los efectos sedantes y anestésicos de sustancias. Esta prueba se basa en la observación directa de la pérdida y recuperación de la coordinación motora, comúnmente llamada reflejo de enderezamiento (*righting reflex*), en modelos murinos tras la administración de un fármaco anestésico, comúnmente un barbitúrico como el pentobarbital (Saunders et al., 1990).

2.7. Plantas con actividad ansiolítica

El efecto sedante de extractos de especies vegetales ha sido comprobado por diferentes investigaciones. Erjon et al. (2017) demostraron que el extracto etanólico de *Daucus carota* L. tiene actividad sedante en ratones a una concentración de 560 mg/Kg. De igual manera, Holanda et al. (2020) analizaron *Passiflora tenuifila* Killip, los extractos etanólicos del fruto de esta especie demostraron tener actividad sedante al ser suministrados en concentraciones de 200 y 400 mg/kg. En este estudio la actividad sedante fue atribuida a los ácidos fenólicos y flavonoides. La actividad ansiolítica de estos mismos extractos evaluada por medio del LCE no tuvo resultados positivos.

En México existen algunas variedades de plantas que son utilizadas por la población por sus efectos ansiolíticos y sedantes, muchos de estos han sido científicamente comprobados. En una recopilación bibliográfica Waizel (2006) encontró que en las plantas que más se utilizan para este fin son: Flor de Tila (*Tilia vulgaris* Haine), Toronjil (*Agastache mexicana*), Valeriana (*Valeriana officinalis* L.), Ruda (*Ruta graveolens* L), Pericón (*Tagetes lucida* Cav), Flor de Azahar (*Citrus sinensis* Osbeck) y Damiana (*Turnera diffusa* Willd). Algunas otras especies que también han sido estudiadas son: *Galphimia glauca*, la cual resultó tener efectos ansiolíticos atribuidos principalmente a la presencia de galfiminas, que son triterpenos producidos a partir del metabolismo secundario de esta planta (Cardoso-Taketa et al., 2008; Ortiz et al., 2010). *Salvia elegans* también es una especie vegetal que ha demostrado tener efectos antidepresivos y ansiolíticos atribuidos a la presencia de compuestos como ácido oleanólico y terpenos (rosifoliol y agaraspirol) identificados por técnicas cromatográficas a partir de extractos de sus flores y hojas, que fueron evaluados mediante métodos como prueba de natación forzada, prueba de laberinto de la cruz elevada y prueba de campo abierto en ratones (Martínez-Hernández et al., 2021). El polifenol epigallocatequina-3-galato presente en el té verde, *Camellia sinensis*, es un potente antioxidante, al cual se le han atribuido efectos sobre el sistema nervioso central, incluyendo la actividad ansiolítica *in vivo* (Vignes et al., 2006). Gutiérrez et al. (2014) también recopilaron información sobre las especies vegetales que en la medicina tradicional mexicana se utilizan para el tratamiento de ansiedad, donde además de las mencionadas anteriormente destacan *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita*, *Humulus lupulus*, *Tilia americana*. var, *mexicana*, *Lippia alba*, *Ipomoea stans*, *Casimiroa edulis*, *Montanoa frutescens*, *Magnolia dealbata*, *Annona diversifolia* y *Loeselia mexicana*.

3. JUSTIFICACIÓN

El cacao es una planta de gran importancia económica, social y cultural en diversas partes del mundo, incluyendo a México, por lo que el conocimiento sobre sus compuestos fitoquímicos y propiedades farmacológicas gana relevancia.

Basados en la gran cantidad de reportes de compuestos fitoquímicos con actividad biológica obtenidos a partir de diferentes partes de la planta *Theobroma cacao* L., además del conocimiento sobre la existencia de la amplia diversidad genética de esta planta, se hace relevante determinar la concentración de metilxantinas en muestras de flores recolectadas en Cunduacán Tabasco. El planteamiento del presente proyecto de investigación nace a partir de la información etnomédica compartida por el médico tradicional Efrén Hernández Maldonado, quien forma parte de la cultura maya yokot'an en la localidad de Miahuatlán, ubicada en el municipio de Cunduacán, Tabasco, México. Los médicos tradicionales de esta cultura emplean las flores de cacao en rituales que se vinculan con posibles propiedades ansiolíticas y sedantes, por lo que la corroboración científica mediante el uso de modelos como de la cruz elevada y de potenciación del sueño inducido en ratones se hace pertinente. De manera adicional, con el fin de ampliar el conocimiento sobre el potencial antioxidante del material vegetal recolectado en municipio de Cunduacán, Tabasco, México, la evaluación antirradicalaria mediante el ensayo DPPH permitirá conocer mejor el potencial químico y farmacológico de las flores y semillas de cacao que se encuentra en la zona de muestreo, lo que le conferirá un mayor valor agregado.

4. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos obtenidos a partir de flores de *Theobroma cacao* presentarán actividad antioxidante, además de acción ansiolítica y sedante en un modelo murino.

5. OBJETIVOS

5.2. Objetivo general

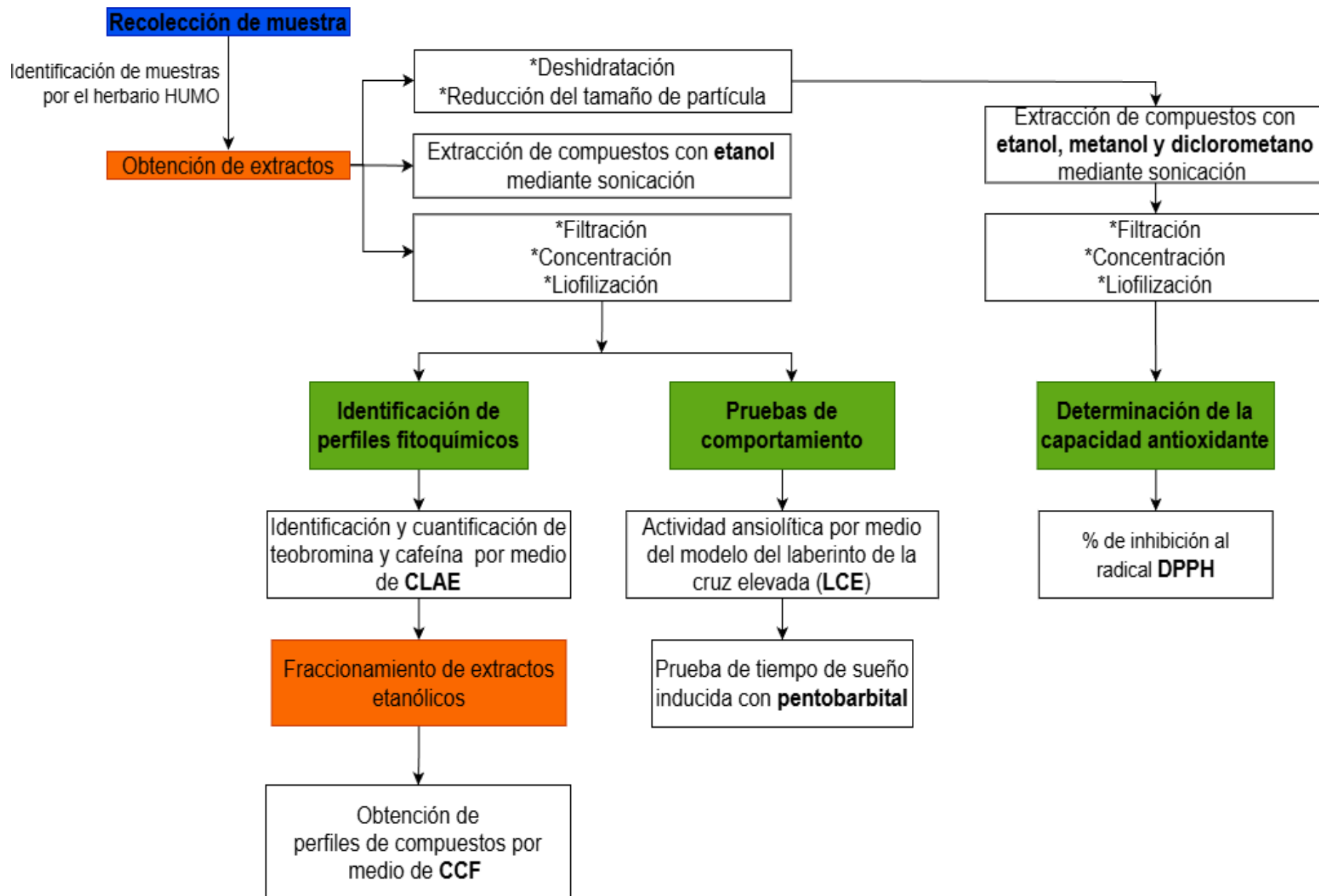
Evaluar la actividad antioxidante, ansiolítica y sedante de extractos de diferentes polaridades de flores del árbol de *Theobroma cacao* L., recolectadas en el municipio de Cunduacán Tabasco e identificar la presencia de metilxantinas.

5.3. Objetivos específicos

1. Cuantificar la presencia de teobromina y cafeína en el etanólico obtenido de flores de *T. cacao* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
2. Determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico, metanólico y diclorometánico de flores de flores de *T. cacao*.
3. Determinar de actividad ansiolítica del extracto etanólico de flores de *T. cacao* por medio del modelo de cruz elevada.
4. Determinar de actividad sedante del extracto etanólico de flores de *T. cacao* por medio de la prueba de tiempo de sueño con pentobarbital.

6. METODOLOGÍA

6.2. Desarrollo metodológico



6.3. Muestreo y conservación de las muestras

Mediante recorridos a cacaotales del municipio Cunduacán Tabasco, México, guiados por los productores de la misma zona, se identificaron ejemplares de árboles de *Theobroma cacao* L. en las coordenadas 18.011012, - 93.304672. La planta fue identificada por el herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con el folio **28771**.

De estos árboles se recolectaron flores maduras y recién desprendidas durante el mes de julio del año 2023. Así mismo se obtuvieron semillas del fruto de cacao de los mismos árboles con el objetivo de comparar ambos perfiles fitoquímicos. Las muestras recolectadas fueron deshidratadas, con el objetivo de conservar y concentrar los compuestos presentes en flores y semillas. Para el caso específico de las semillas, estas fueron lavadas con agua para retirar el mucílago, deshidratadas, trituradas y posteriormente separadas de la testa.

6.4. Preparación de extractos

Las muestras de los materiales vegetales (flores y semillas) deshidratadas fueron pulverizadas con el fin disminuir el tamaño de partícula y mejorar la extracción de los compuestos. La extracción de fitoquímicos de ambas muestras se realizó por duplicado utilizando como disolvente etanol al 96° y mediante sonicación, realizando tres extracciones sucesivas durante 15 minutos cada una, con un equipo de sonicación Fisher Scientific® FS20. En el caso de las muestras utilizadas para el análisis de actividad antioxidante, además de extracciones con etanol se realizaron extracciones con metanol y diclorometano, por separado.

Al completar los ciclos de cada extracción los extractos obtenidos fueron filtrados para separar el material vegetal. La concentración de los extractos se realizó eliminando el solvente mediante centrifugación al vacío en un equipo Eppendorf Vacufuge pluss a 30°C. Posteriormente cada extracto fue liofilizado con el fin de eliminar el remanente de humedad.

De igual manera, de la mano de los médicos del consejo indígena del estado de Tabasco se obtuvo un extracto acuoso (infusión) ritualizado a partir de 52 flores de cacao provenientes de la misma zona de muestreo. Esta infusión fue liofilizada para poder obtener un extracto acuoso concentrado (AF).

6.5. Identificación de perfiles de compuestos

El análisis fitoquímico se realizó mediante técnicas cromatográficas como cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

6.4.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La obtención de los perfiles de compuestos por medio de cromatografía de capa fina CCF se realizó tanto para los extractos etanólicos de flores y semillas, así como a las fracciones de ambos extractos realizadas con solventes de diferentes polaridades (hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua). Como fase estacionaria se utilizaron placas de CCF fase normal de gel de sílice 60 en placas de CCF (SIGMA ALDRICH®) de 200 µm de grosor, fondo de aluminio y 10-12 µm de tamaño de partícula.

El desarrollo del método se realizó en un equipo CAMAG® TLC VISUALIZER, aplicando directamente 3 µL de cada extracto reconstituido (a una concentración de 30 mg/mL) sobre la placa dejando 0.5 cm de separación entre cada punto de aplicación. Para la elución de los compuestos se utilizaron cuatro sistemas de fases móviles diferentes, la primera fase fue diclorometano:hexano ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$) en una proporción 95:5 v/v para eluir los compuestos de menor polaridad. La segunda fase fue cloroformo metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 75:25 v/v. Las fases más polares, tercera y cuarta, estuvieron constituidas por butanol:agua:ácido acético ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$) en proporciones de 54:31:15 v/v, así como acetato de etilo:metanol:agua ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) 81:11:8 v/v. Como agentes reveladores se utilizaron vainillina en H_2SO_4 , anisaldehído en H_2SO_4 y el reactivo de Dragendorff. La visualización y análisis de las placas se realizaron con luz visible y luz UV a 254 y 365 nm mediante el programa VISIÓN CATS.

6.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La identificación de las metilxantinas teobromina y cafeína en los extractos etanólicos crudos obtenidos de flores y semillas fueron analizados mediante la técnica de CLAE, tomando como base el método establecido por Pura Naik (2001), donde la fase móvil utilizada fue agua:acetonitrilo ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) en una proporción (8:2) v/v. En esta investigación para la fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa C18 Shiseido 92635 (5µm, 4.6 x 250 mm).

La preparación de los estándares y muestras previos al análisis fue la siguiente: los estándares de cafeína y teobromina para las curvas de calibración fueron disueltos y filtrados en fase móvil previamente filtrada y sonicada. En el caso de los extractos liofilizados la disolución se realizó en la misma fase móvil y con ayuda de sonicación durante 1 minuto. Las soluciones resultantes fueron filtradas con una unidad de filtración Nylon de 0.45 µm.

Cada muestra se analizó por triplicado en un equipo CLAE (Waters 600) que cuenta con un detector de matriz de fotodiodos (Waters 996). El análisis se realizó con una columna de fase reversa C18 Shiseido (92635) bajo las siguientes condiciones: flujo de 1 mL/min, temperatura ambiente, volumen de inyección de 10 µL a partir de una (solución a 30 mg/mL) y detección a longitud de onda de 276 nm.

6.6. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por triplicado a los extractos de flores y semillas obtenidos con etanol, metanol y diclorometano, a las concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.06 mg/mL y 0.03 mg/mL. Se empleó la metodología adaptada de Prior (2005) para el % de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a 0.1 mM en metanol 80%. Este ensayo se basa en medir la disminución de la absorbancia a 515 nm cuando el radical DPPH es reducido por un antioxidante por medio de la donación de electrones. Se realizó una curva de calibración utilizando como antioxidante un estándar de hidroquinona Sigma Aldrich® a diferentes concentraciones (anexo 5). Para este ensayo se utilizó un equipo SpectraMax® iD3.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

6.7. Determinación de la actividad ansiolítica y sedante

Se analizó la actividad ansiolítica mediante el ensayo de la LCE y la actividad sedante mediante la prueba de tiempo de sueño inducida con pentobarbital sódico (PBT) de los extractos etanólicos de las flores de *T. cacao*. Para ello se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 con un peso promedio de 35 g. Para dichos análisis, el presente protocolo fue sometido a revisión por el comité de ética y seguridad del Centro de Investigación en Biotecnología UAEM. Asimismo, se respetaron los lineamientos establecidos en norma oficial mexicana NOM-012-ZOO-1993 Y NOM-062-ZOO-1999.

Previo a los ensayos, durante 5 días los ratones fueron acondicionados en un laboratorio en condiciones de silencio, luz tenue, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Los animales fueron alojados en grupos de 5 individuos por jaula y suministrados con agua y alimento *ad libitum*. Durante los ensayos los ratones fueron seleccionados de manera aleatoria para dividirse en 5 grupos: grupo control negativo (CN), grupo control positivo (CP) y grupos muestra de extracto etanólico de flores (FL), extracto etanólico de semillas (SM) y extracto acuoso de flores (AF).

Los ratones del control negativo fueron administrados vía intraperitoneal con disolución salina (0.75 ml/100 g). Los ratones para el control positivo fueron suministrados con diazepam por la misma vía (0.1 mg/100 g) y los ratones de los grupos muestra recibieron 50 mg/100 g del extracto correspondiente para cada grupo (Cruz et al., 1994). Para preparar las disoluciones se utilizó como vehículo DMSO al 2.5% en solución salina.

Después de la administración correspondiente para cada grupo, el comportamiento de los ratones fue evaluado por medio de los dos modelos neurofarmacológicos antes mencionados.

6.6.1 Prueba del laberinto en cruz elevada (LCE)

El modelo de LCE consta de cuatro brazos de 10 cm de ancho y 50 cm de largo contrapuestos en forma de cruz y elevados del suelo 50 cm; dos de los brazos son cerrados con paredes de 20 cm de altura y dos de ellos son abiertos sin protección alguna. Cada par fue colocado de manera perpendicular.

La prueba se llevó a cabo según el método de Cruz *et al.* (1994). Treinta minutos después de la administración de la dosis correspondiente cada ratón fue colocado en el centro del laberinto. Con ayuda de un equipo de videograbación, durante 5 minutos se registró el número de entradas en cada uno de los brazos del LCE, así como el tiempo que pasó en los brazos cerrados y abiertos. Las puntuaciones se evaluaron aplicando la fórmula: $[\text{abierto}/(\text{abierto} + \text{cerrado})] \times 100$. Las paredes fueron completamente limpiadas antes de estudiar a cada individuo. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnett para la comparación de los grupos experimentales con el control positivo, considerando diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$.

6.6.2. Prueba de potenciación del tiempo de sueño

Siguiendo la metodología de Fernández *et al.* (2005), en este ensayo se indujo el sueño de los ratones con una inyección de pentobarbital sódico (40 mg/kg), después de 30 minutos de la administración de la solución correspondiente a cada grupo, control positivo (CP), control negativo (CN), extracto etanólico de flores (FL), extracto etanólico de semillas (SM) y extracto acuso de flores (AF). El tiempo de sueño se determinó como el intervalo entre el tiempo de inicio de la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación. Los resultados se puntuaron en relación con las observaciones de cada grupo en ambas pruebas farmacológicas.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnett para la comparación de los grupos experimentales con el control negativo, considerando diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.2. Rendimiento de los extractos vegetales

En la figura 7 se pueden observar las flores de *T. cacao* recién recolectadas (a) y las flores obtenidas después del proceso de deshidratación (b).



Figura 7.a) Flores de *T. cacao* maduras y frescas. b) Flores de *T. cacao* deshidratadas (fotografía de autoría propia).

Los extractos etanólicos obtenidos a partir de los materiales vegetales deshidratados (fig. 8) mostraron un rendimiento promedio de 1.22% y 1.25% para flores y semillas, respectivamente. Los rendimientos obtenidos después de la evaporación de los disolventes orgánicos y liofilización de los extractos de ambos materiales vegetales (fig. 9) fue de 1.22% (570 mg) para las flores y de 1.25% (590 mg) para las semillas. Estos datos se pueden observar en la Tabla 1.

#Tabla 1. Rendimiento de los extractos de flores y semillas de *T. cacao*

Muestra	Rendimiento	Peso total del extracto seco
Flor	1.22 %	570 mg
Semilla	1.25%	590 mg

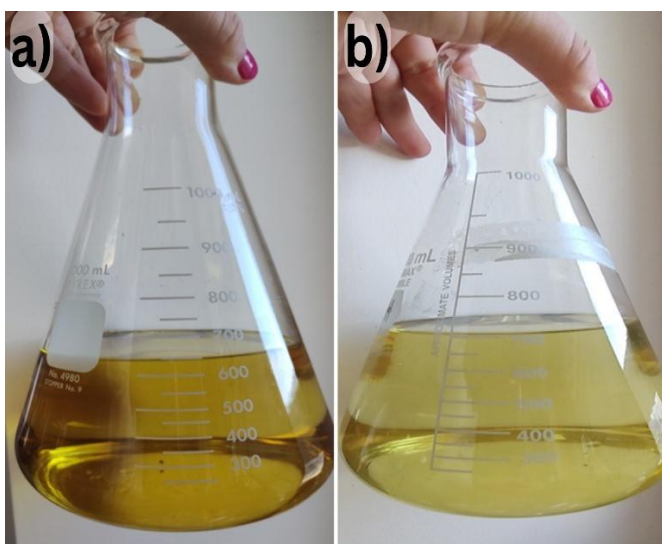


Figura 8. Extractos etanólicos de materiales vegetales deshidratados. a) flores de *T. cacao*, b) semillas de *T. cacao*.



Figura 9. Extracto etanólico seco de flores de *T. cacao*.

7.2 Obtención de los perfiles cromatográficos por medio del análisis de cromatografía en capa fina (CCF)

El desarrollo de perfiles cromatográficos de las fracciones de ambas muestras se realizó según lo mencionado en la tabla 2, comparando las fracciones de flores y semillas.

Tabla 2. ID de fracciones y extractos de flores y semillas.

ID	MUESTRAS DE FLORES	ID	MUESTRAS DE SEMILLAS
1	Fracción acuosa	7	Fracción acuosa
2	Fracción butanólica	8	Fracción butanólica
3	Fracción de acetato de etilo	9	Fracción de acetato de etilo
4	Fracción clorofórmica	10	Fracción clorofórmica
5	Fracción hexánica	11	Fracción hexánica
6	Extracto etanólico (crudo)	12	Extracto etanólico (crudo)

Durante la primera fase experimental se realizó el análisis de cromatográfico en capa fina (CCF) con las fases móviles 1 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 95/5 v/v) y 2 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 54/31/15 v/v), de las siguientes muestras: extracto etanólico de semillas (12), extracto etanólico de flores (6); y las diferentes fracciones del extracto de flores, fracción de hexánica (5), fracción de clorofórmica (4), fracción acetato de etilo (3), fracción con butanólica (2) y fracción acuosa (1).

La revelación de las placas de CCF nos indicó que, la fracción de extracto de flores con mayor cantidad de grupos de compuestos correspondió a la fracción menos polar, que fue la hexánica (5). Esto tras usar la fase móvil del sistema 1 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 95/5 v/v), y revelar la CCF en vainillina/ H_2SO_4 (fig. 10).

En la figura 10 la coloración de todas las manchas que se pueden observar en luz visible es de color morado o púrpura, lo que sugiere que los compuestos correspondientes a estas manchas pudieran ser diferentes tipos de terpenos, los cuales se encuentran en los extractos etanólicos de ambas muestras y en las fracciones de menor polaridad (5, 4 y 3). Sin embargo, no se puede descartar que dichas manchas pudieran corresponder a los ácidos grasos y ceras.

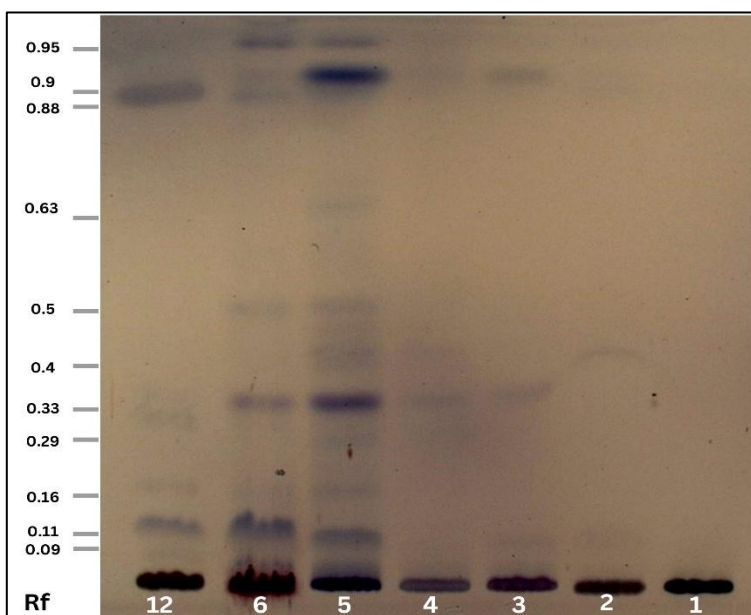


Figura 10. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de semillas de *T. cacao* (12), flores de *T. cacao* (6) y fracciones de extractos de flores de *T. cacao*. (5-1). Fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 95/5 v/v. Revelada en vainillina/ H_2SO_4 . Luz visible.

En la figura 11 se muestra la misma placa observada en luz UV a 365 nm, donde el patrón de manchas fue muy similar al observado en luz visible, tanto los extractos etanólicos de semillas como de flores. Se observa una mayor acumulación de compuestos de baja polaridad, con Rf 0.90 principalmente en el extracto de semillas (12), así como en la fracción hexánica (5), lo que podría corresponder a la presencia de ácidos grasos. En este sentido, el extracto de flores (6) prácticamente no presenta esta mancha. El extracto de semillas (12) presenta otra mancha importante con Rf 0.11, que está presente en el extracto de flores (6), donde es la mancha más abundante. El extracto de flores (6) presenta una mancha con Rf 0.33, que es la segunda más abundante y prácticamente inexistente en el extracto de semillas (12), y que, además, se ha acumulado en la fracción hexánica (5) (fig. 10 y 11).

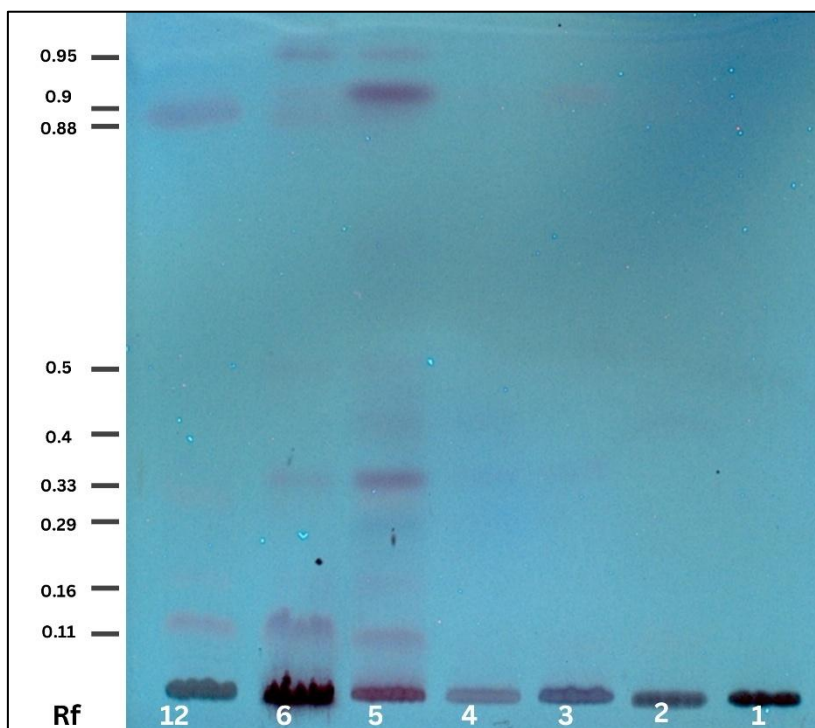


Figura 11.

Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de semillas de *T. cacao* (12), flores de *T. cacao* (6) y fracciones de extractos de flores de *T. cacao* (5-1). Fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 95/5 v/v. Revelada en vainillina/ H_2SO_4 - Luz UV 365 nm.

Las figuras 12, 13 y 14 corresponden a las muestras eluidas en el sistema de fases 2. (butanol: $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 54/31/15 v/v); esto con el objetivo de poder separar y observar los compuestos de mayor polaridad. En la figura 12, se muestra la placa revelada con vainillina/ H_2SO_4 y observada en luz visible, que permite visualizar en el extracto etanólico de semillas (12) cuatro manchas principales con Rf 0.91, 0.51, 0.39 y 0.34, siendo esta última mancha la mayoritaria en la placa revelada con vainillina/ H_2SO_4 y luz UV 365 nm. En el extracto etanólico de flores (6), se apreciaron dos manchas con coloración rojiza, con Rf 0.34 y 0.45, que en el sistema polar que en el que se corrió la placa podría tratarse de derivados de antocianinas, que se podrían relacionar con el color de las flores. La mancha mayoritaria en la fracción 1, con Rf 0.39, y de coloración gris podría corresponder a compuestos glicosilados, como saponinas, o bien carbohidratos. Adicionalmente, se observa que el extracto etanólico de flores (6) es la muestra con mayor concentración de compuestos polares, que no fueron identificados en ninguna de las fracciones analizadas. De igual manera se observó que en la muestra 12, así como las fracciones 1 y 2 se encuentran grupos de compuestos minoritarios, que por su coloración pudieran ser derivados glicosilados.

La placa de la figura 13 fue visualizada con luz UV a 365 nm después de ser revelada en vainillina/ H_2SO_4 . En esta placa se pudo observar que los compuestos con Rf 0.34 y 0.45, que en la figura 12 se muestran de coloración roja, en la presente placa no presentan fluorescencia, contrario a lo que se observó para los compuestos menos polares con Rf 0.91. En la figura 14 se puede visualizar la placa con luz UV a 254 nm después de ser revelada en vainillina/ H_2SO_4 , donde resalta la presencia de una mancha con Rf 0.62, mayoritaria, en el extracto de semillas (12), la cual en el extracto de flores se aprecia de forma minoritaria.

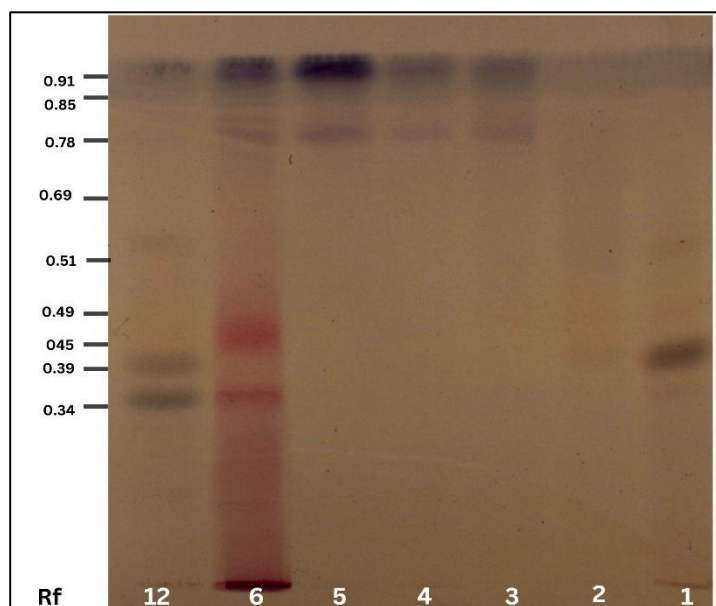


Figura 12. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de semillas de

T. cacao (12), flores de *T. cacao* (6) y fracciones de extractos de flores de *T. cacao* (5-1). Fase móvil Butanol:H₂O:CH₃COOH 54/31/15 v/v. Revelada en vainillina/H₂SO₄. Luz visible.

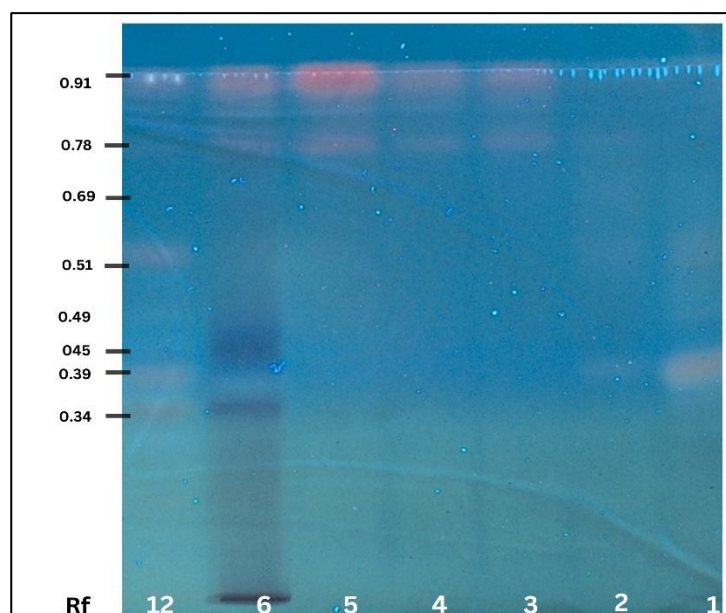


Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de semillas de

T. cacao (12), flores de *T. cacao* (6) y fracciones de extractos de flores de *T. cacao* (5-1). Fase móvil Butanol:H₂O:CH₃COOH 54/31/15 v/v. Revelada en vainillina/ H₂SO₄. Luz UV 365 nm.

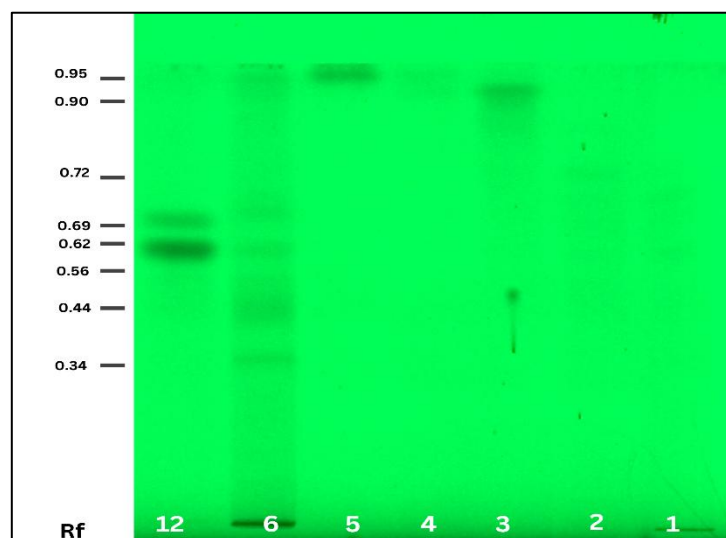


Figura 14. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de semillas de

T. cacao (12), flores de *T. cacao* (6) y fracciones de extractos de flores de *T. cacao* (5-1). Fase móvil Butanol:H₂O:CH₃COOH 54/31/15 v/v. Revelada en vainillina/ H₂SO₄. Luz UV 254 nm.

Posteriormente, para poder comparar la similitud de compuestos presentes entre los extractos etanólicos crudos de flores (6) y semillas (12), se decidió realizar el fraccionamiento de los estos extractos mediante la extracción secuencial con solventes de polaridades crecientes, para simplificar los perfiles, primero con hexano (11), seguido de cloroformo (10), acetato de etilo (9), butanol (8) y agua (7), como se muestra en la tabla 2. A partir de las diferentes fracciones tanto de flores como de semillas se lograron identificar posibles grupos de compuestos similares a los obtenidos en el análisis anterior.

La figura 15 corresponde a una cromatoplaaca eluída con el sistema 1 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$) 95:5 v/v, revelada con vainillina en H_2SO_4 y calentada a 100°C . En esta placa se puede observar la separación de compuestos en las fracciones 10, 5, 11, y los extractos de flores (6) y semillas (12). En dichas fracciones las manchas observadas de color rojo sobre los Rf 0.05 y 0.1 podrían corresponder a terpenos, flavonoides de baja polaridad (flavanonas, isoflavanonas o flavonoles) o esteroides. En el caso de las manchas blancas que revelaron de forma más intensa y difusa, con Rf 0.61 podrían corresponder a compuestos de menor polaridad como los ácidos grasos, ya que estas fracciones extrajeron compuestos de baja polaridad presentes en las semillas.

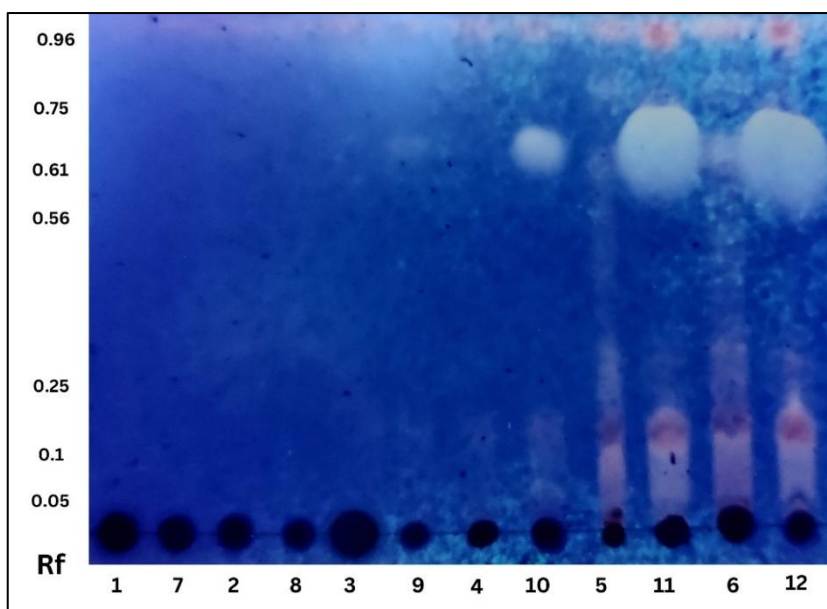
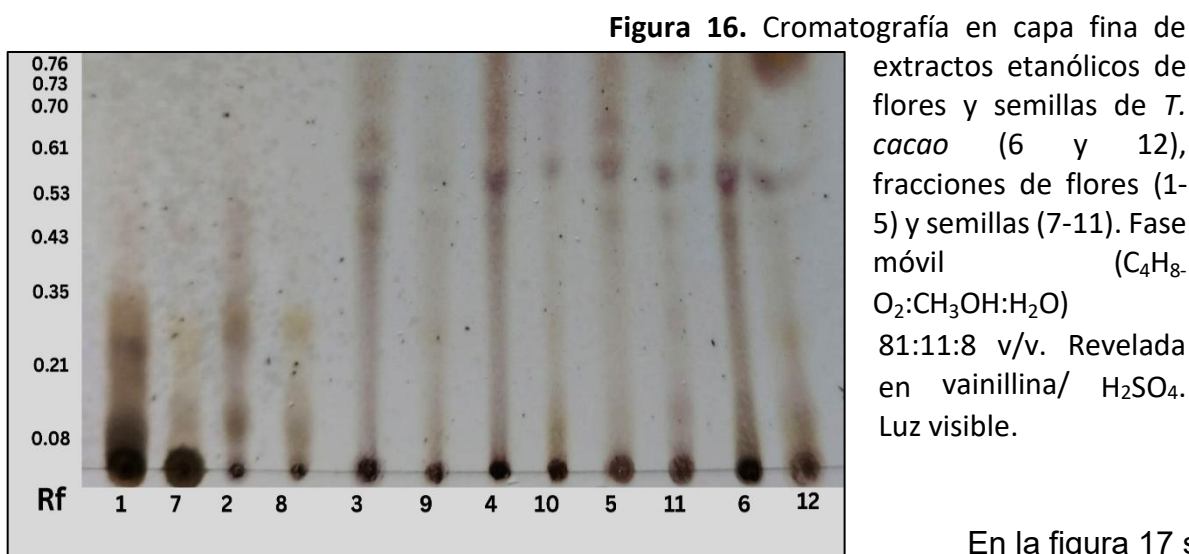


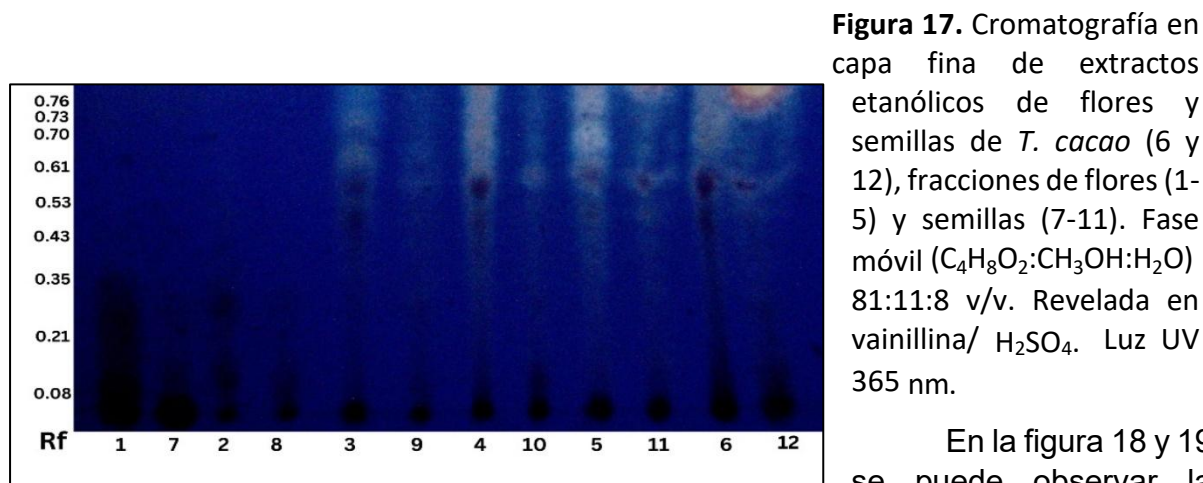
Figura 15. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* (6 y 12), fracciones de flores (1-5) y semillas (7-11). Fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 95/5 v/v. Revelada en vainillina/ H_2SO_4 . Luz UV 365 nm.

La figura 16 corresponde a las muestras eluídas con acetato de etilo:metanol:agua ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) 81:11:8 v/v, reveladas con vainillina en H_2SO_4 y observadas en luz visible. En esta figura se puede observar que, en todas las fracciones de ambas muestras, así como en los extractos etanólicos se lograron separar compuestos a diferentes Rf tendientes en su mayoría a ser manchas de tonalidades púrpuras seguidas por manchas amarillas y grises. En este sistema cromatográfico las manchas correspondientes a los Rf 0.53 y 0.61 presentes en los extractos de flores (3, 4, 5 y 6) y en los extractos de semillas (9, 10, 11 y 12) presentaron tonalidades purpura, por lo que se supone que podrían ser compuestos fenólicos y flavonoides.

En los extractos de flores 1 y 2 y en los extractos de semillas 7-12, se pudieron separar algunos compuestos de tonalidades amarillas observados en los Rf 0.21. Los compuestos de manchas con Rf 0.21, por su polaridad en la fase móvil empleada, pudieran corresponder principalmente a compuestos tipo azúcares. Finalmente, bajo estas condiciones también se pudieron observar algunas manchas de color gris (Rf 0.08) en las fracciones de flores (1 y 2) y semillas (7, 8, 11 y 12), las cuales al ser reveladas con vainillina son representativas de compuestos glicosilados como saponinas o carbohidratos.



En la figura 17 se puede apreciar el mismo sistema cromatográfico anterior revelado con vainillina en H_2SO_4 y observado en luz UV a 365 nm. Basados en los Rf analizados en la figura anterior y en la coloración exhibida por las manchas, se puede suponer que los grupos de compuestos que se observan son los ya mencionados anteriormente.



En la figura 18 y 19 se puede observar la placa con las muestras eluídas en el sistema de fases cloroformo:metanol ($CHCl_3:CH_3OH$) 75:25 v/v, reveladas con anisaldehído en H_2SO_4 y observados en luz visible (fig. 18) y posteriormente bajo UV a 365 nm (fig. 19). En la figura 18, se pueden

observar manchas con tonalidades rosas y púrpuras principalmente en el Rf 0.83, que pueden ser indicativas principalmente de la presencia de compuestos lipídicos, esteroides o bien terpenos. En ambas figuras se pueden observar manchas que revelaron con tonalidades oscuras o grises (Rf 0.08, 0.1, 0.48); al igual que en los sistemas anteriores, estos pueden ser indicativos de compuestos glicosilados o bien azúcares.

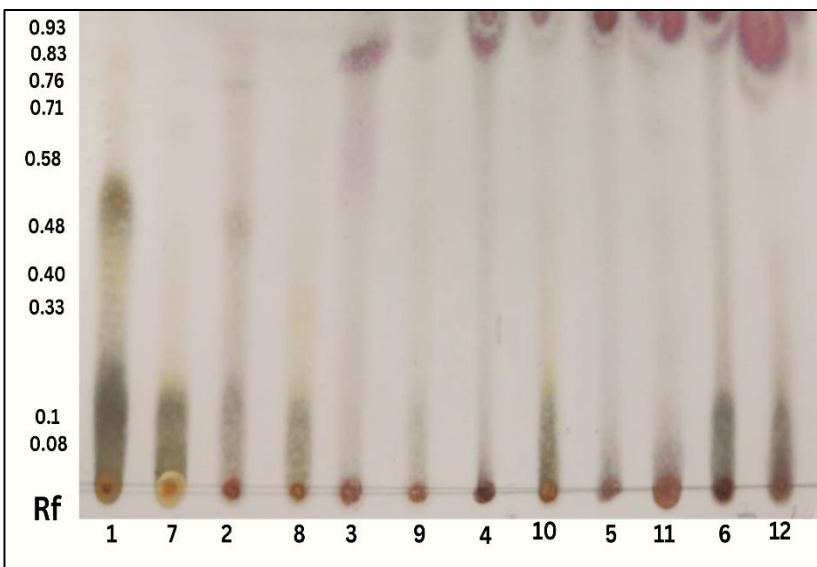


Figura 18. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* (6 y 12), fracciones de flores (1-5) y semillas (7-11). Fase móvil ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 75:25 v/v. Revelada con anisaldehído. Luz visible.

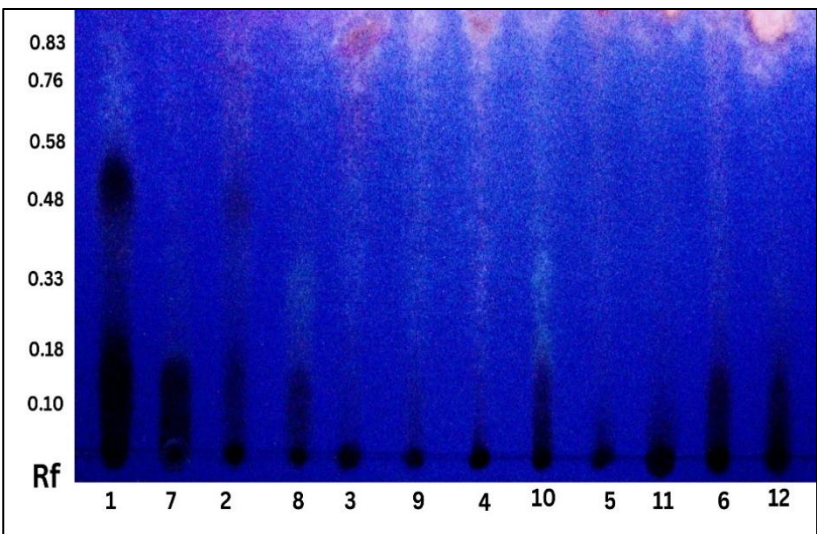


Figura 19. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* (6 y 12), fracciones de flores (1-5) y semillas (7-11). Fase móvil ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 75:25 v/v. Revelada en anisaldehído. Luz UV 365 nm.

Por último, se llevó a cabo la identificación de las metilxantinas cafeína y teobromina en cada una de las fracciones. Para ello se eluyeron las muestras en la fase móvil de acetato de etilo:metanol:agua ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) 81:11:8 v/v, utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff. En la figura 20 se observaron grupos de compuestos principalmente en los Rf 0.40 y 0.45, así como las manchas de los estándares de teobromina y cafeína, que fueron aplicadas en mezcla en el último carril derecho de la placa y sufrieron distorsión en su migración, pero que parecen

corresponder a los compuestos teobromina con Rf 0.40 y cafeína con Rf 0.45. Posteriormente, al revelar la placa de CCF con el reactivo de Dragendorff se pudieron observar (fig. 21) manchas a un Rf de 0.4 en los extractos y fracciones de flores y semillas (6 y 12), que coincide con la teobromina. En la figura 20, las manchas que tuvieron un Rf de 0.45, correspondiente al estándar de cafeína, aparecieron de manera importante en las muestras 10 (fracción clorofórmica de semillas) y 12 (extracto etanólico de semillas), indicando una presencia importante en las semillas y su baja concentración en flores.

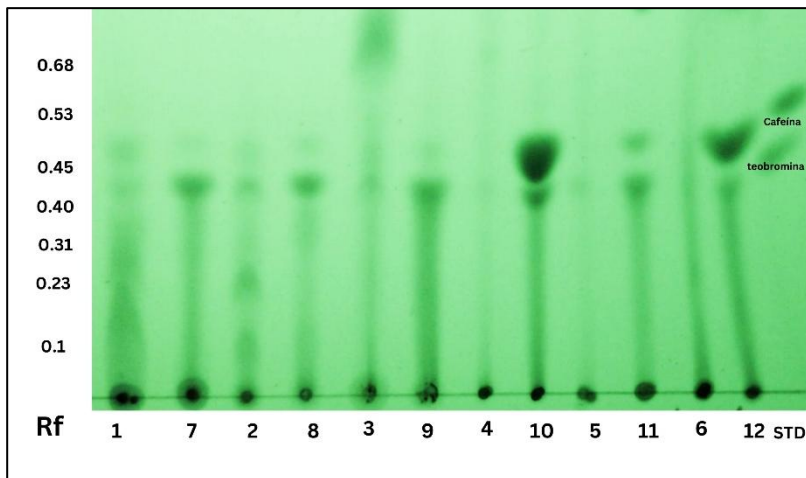


Figura 20. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* (6 y 12), fracciones de flores (1-5) y semillas (7-11) y estándar de cafeína y teobromina (STD) Fase móvil ($C_4H_8O_2:CH_3OH:H_2O$) 81:11:8 v/v. Luz UV 254 nm.

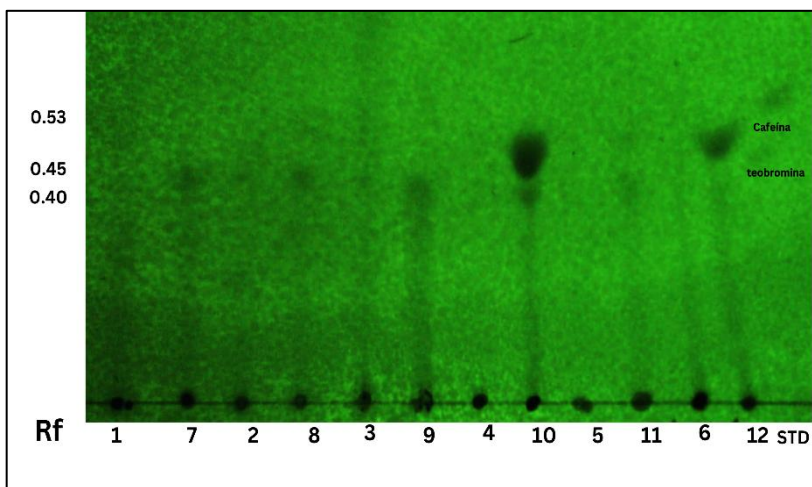


Figura 21. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* (6 y 12), fracciones de flores (1-5) y semillas (7-11) y estándar de cafeína y teobromina (STD) Fase móvil ($C_4H_8O_2:CH_3OH:H_2O$) 81:11:8 v/v. Revelado en Dragendorff Luz UV 254 nm.

7.3. Identificación y cuantificación de metilxantinas en los extractos por medio de CLAE

La cuantificación de las metilxantinas teobromina y cafeína en ambos extractos etanólicos se realizó mediante una curva de calibración para cada uno de los analitos bajo las condiciones ya especificadas en la metodología. Cabe señalar que la identificación de la teobromina y cafeína en las muestras se determinó a través de una coelución de los estándares en las muestras.

Para el perfil cromatográfico del estándar de teobromina el tiempo de retención fue de 4.4 minutos (fig. 22) y del estándar de cafeína el tiempo de retención fue de 7.9 minutos (fig. 23). Dada la diferencia de concentraciones de la teobromina y cafeína en el extracto de flores con respecto al extracto de semillas se realizaron dos curvas de calibración para cada analito a diferentes rangos de concentraciones (anexo), que tuvieron una R^2 superior a 0.99.

Existen pocos estudios que nos provean de información acerca de las características fisicoquímicas, moleculares, así como de actividades biológicas de las flores de *T. cacao* o sus diferentes extractos. En esta investigación se encontraron dos principales compuestos de la familia de las metilxantinas, siendo la teobromina el componente mayoritario, seguido de la cafeína.

Mediante las curvas de calibración (anexo 1-4), se determinó que en el extracto etanólico crudo de flores de *T. cacao* la concentración de cafeína fue de 0.8 mg.g^{-1} y teobromina de 4.17 mg.g^{-1} (Tabla 3). Estos valores son significativamente menores a los encontrados en los extractos de semillas, ya que en estos la concentración de cafeína fue de 51.09 mg.g^{-1} y de teobromina de 75.85 mg.g^{-1} (Tabla 3). En las figuras 24 y 25 se pueden observar los resultados obtenidos a partir del análisis en CLAE y se demuestra que, bajo este método de análisis, la teobromina es el componente mayoritario tanto en flores como en semillas de cacao, siendo la concentración en los extractos de semillas 18 veces mayor que en la encontrada en los extractos de flores. En el caso de la cafeína, la concentración en las flores con respecto a las semillas es 63 veces menor.

La presencia de teobromina y cafeína en diferentes partes del árbol de *T. cacao* ya se ha reportado en diversas publicaciones. Sotelo et al. (2015) reportaron que la concentración de estos compuestos en la cascarilla de cacao, la cual es considerada un desperdicio de la producción de chocolate, es de 0.0209 mg.g^{-1} para la cafeína y de 0.0200 mg.g^{-1} para teobromina. Además, Lo Coco et al. (2007) analizaron la concentración de teobromina y cafeína en pasta de cacao reportando una concentración de 33 mg g^{-1} y 5.6 mg g^{-1} de teobromina y cafeína, respectivamente.

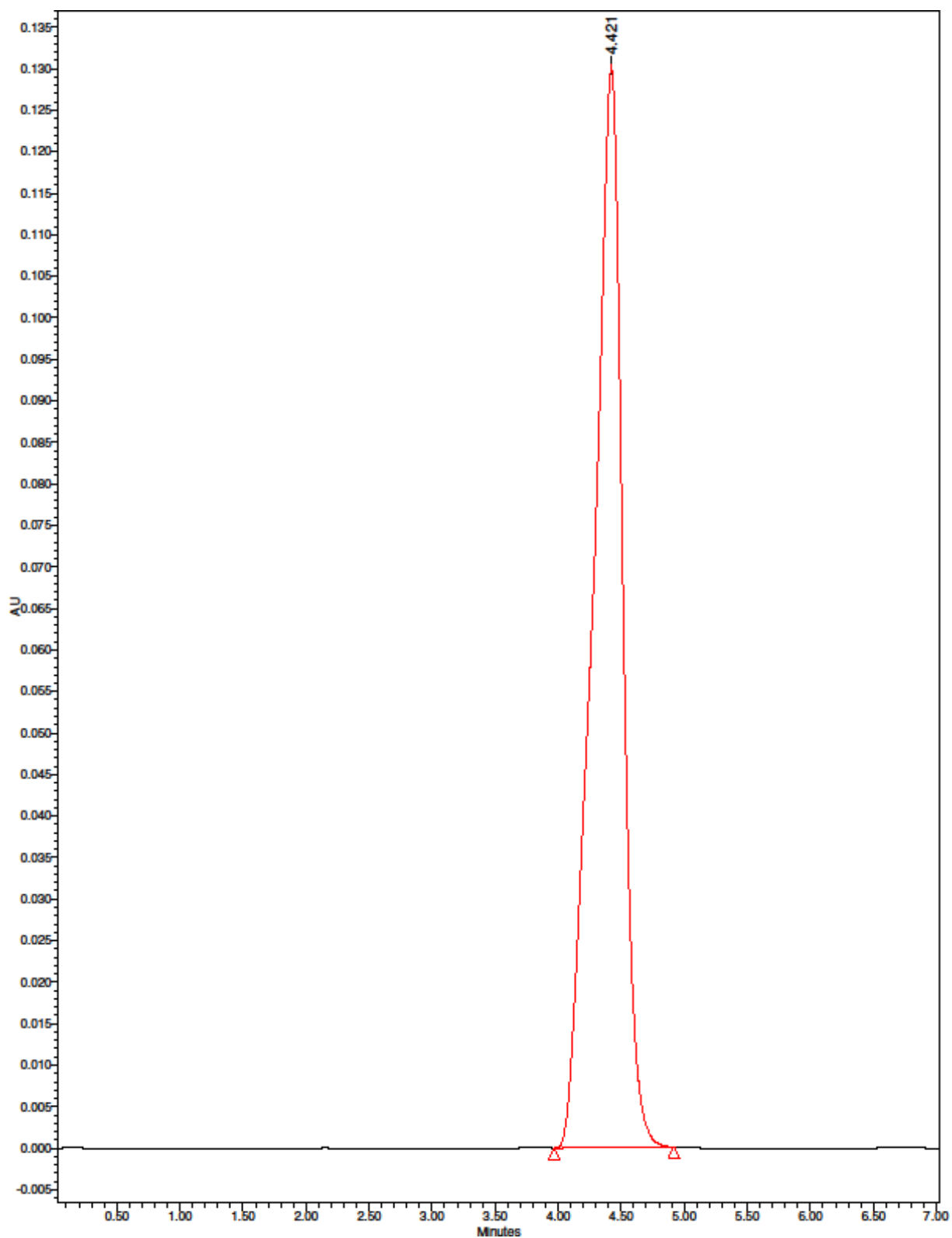


Figura 22. Perfil cromatográfico del estándar de teobromina en CLAE. Fase móvil: H₂O:ACN (80:20), fase estacionaria: Columna Shiseido C18.

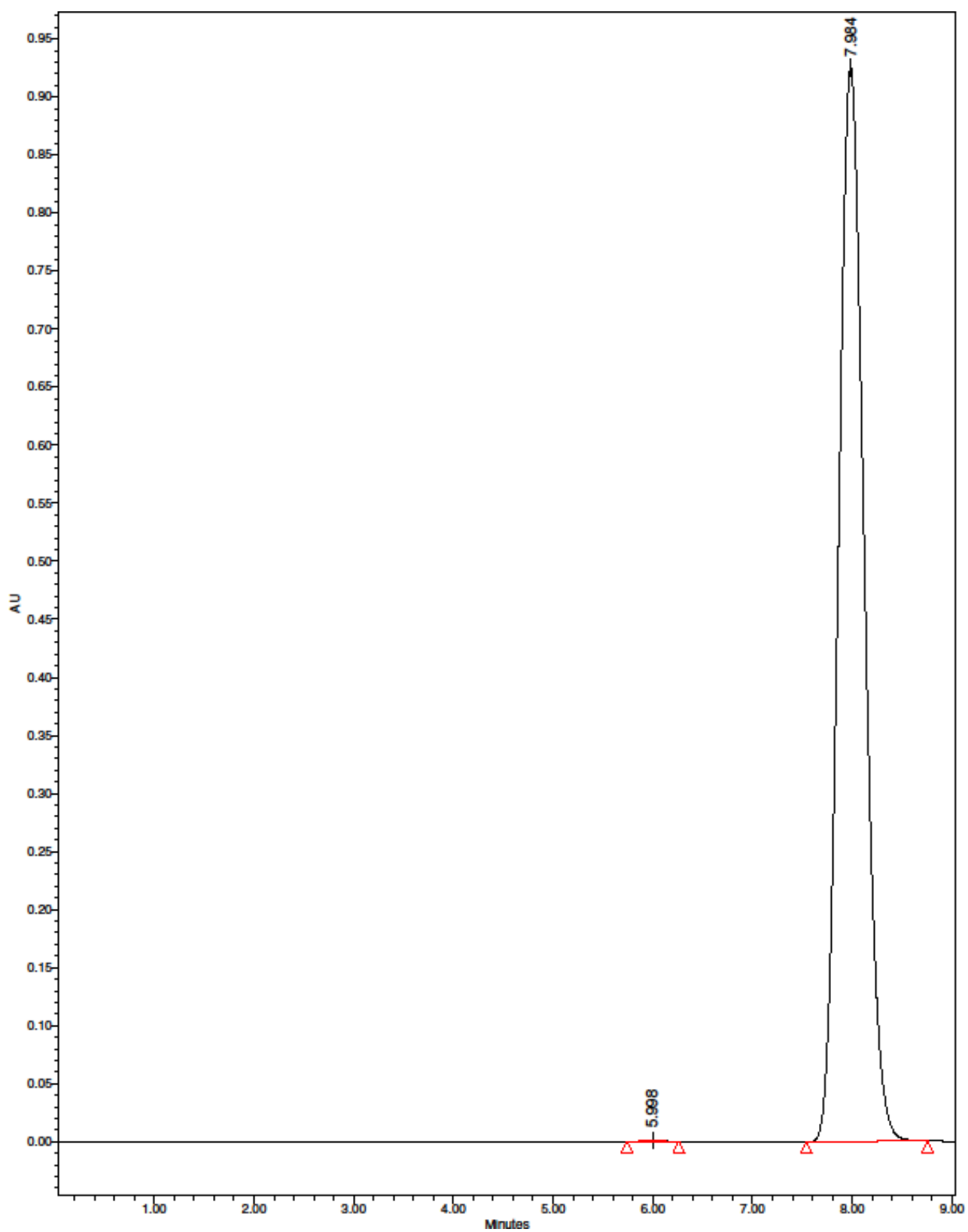


Figura 23. Perfil cromatográfico del estándar de cafeína en CLAE. Fase móvil: H₂O:ACN (80:20), fase estacionaria: Columna Shiseido C18.

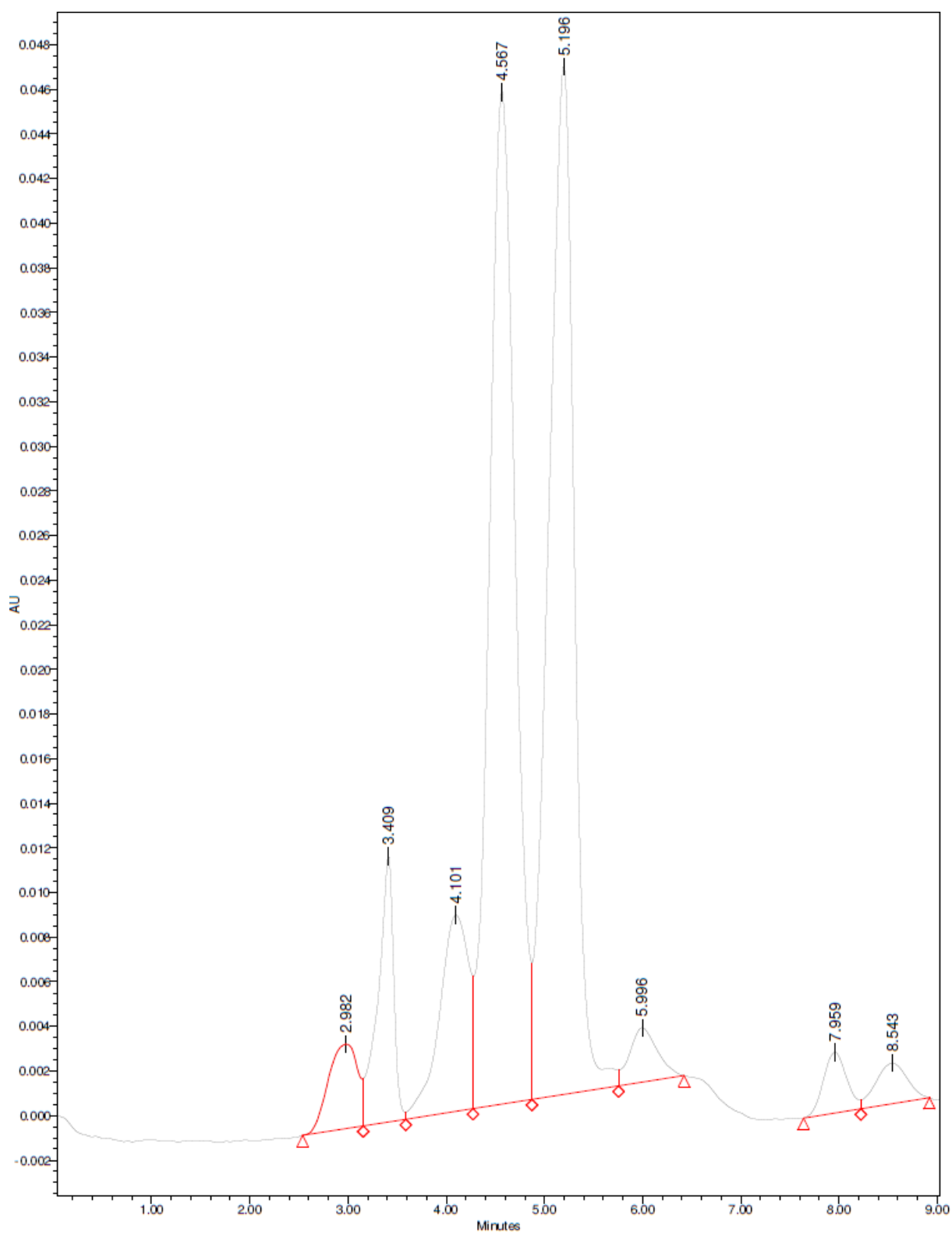


Figura 24. Cromatograma (CLAE) del extracto de flores de *T. cacao*: TR teobromina= 5.196 min, TR cafeína= 7.959 min.

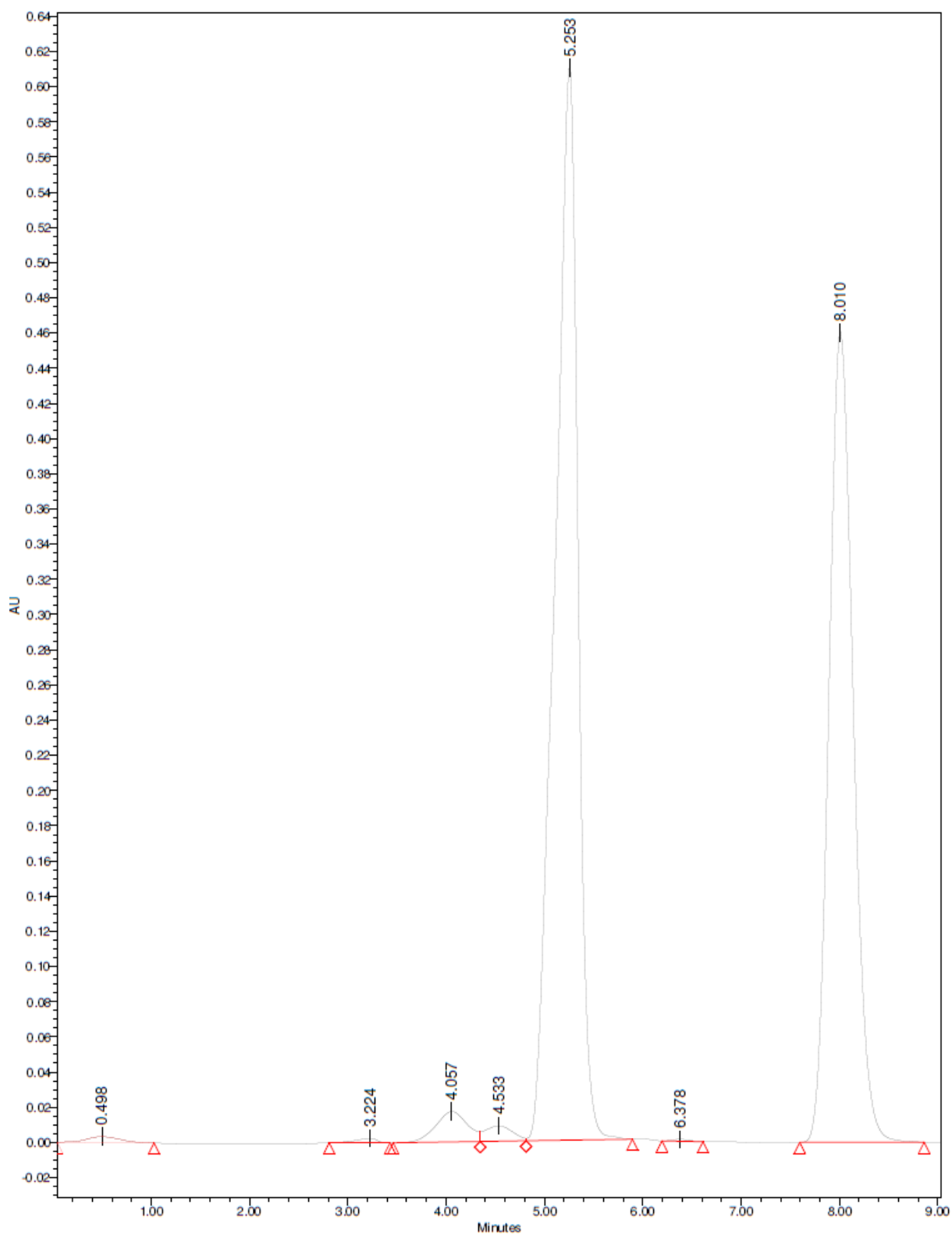


Figura 25. Cromatograma (CLAE) del extracto de semillas de *T. cacao*; TR teobromina= 5.253 min, TR cafeína= 8.010 min.

Específicamente en flores de *T. cacao*, la concentración de teobromina, cafeína y teofilina se reportó por primera vez por Sotelo & Alvarez (1991). Dicha investigación se realizó mediante CLAE y bajo un método de separación diferente al presentado en el presente trabajo. Los resultados demostraron que la concentración de teobromina en flores deshidratadas fue cercana a los 0.80 mg.g⁻¹ de flor seca, así como la concentración de cafeína fue aproximada a 0.20 mg.g⁻¹ de muestra seca. En ese estudio la diferencia entre la concentración de las dos metilxantinas dentro de las flores es considerablemente mayor para la teobromina en comparación con la cafeína, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, la concentración de ambos compuestos es significativamente mayor en las muestras de esta investigación provenientes de Cunduacán Tabasco.

Tabla 3. Concentración de teobromina y cafeína en diferentes extractos de *T. cacao*.

Muestra	Cafeína (mg.g ⁻¹)	Teobromina (mg.g ⁻¹)	Referencia
Extracto etanólico de flores de <i>T. cacao</i> (liofilizado)	0.8	4.17	Presente trabajo
Extracto etanólico de semillas de <i>T. cacao</i> (liofilizado)	51.09	75.85	Presente trabajo
Extracto crudo de flores deshidrata	0.2	0.8	Sotelo & Alvarez (1991)
Pasta de cacao	5.6	33	Lo Coco et al. (2007)

Identificar la presencia de metilxantinas en el material de análisis es importante, debido a que en algunas investigaciones se han reportado las actividades biológicas de la teobromina. Yoneda et al. (2017) indicaron que el consumo oral de teobromina por ratones promovió la inhibición de la fosfodiesterasa en el cerebro de los sujetos de estudio; la fosfodiesterasa hidroliza y por lo tanto disminuye la concentración de moléculas como el adenosín monofosfato cíclico, el cual está relacionado directamente con moléculas que participan en procesos cerebrales como el aprendizaje, la memoria y la supervivencia. Además, considerando que las metilxantinas son moléculas estimulantes del sistema nervioso central, principalmente la cafeína, su baja concentración en el extracto de flores, en comparación con las semillas, permite suponer que el uso de flores como ansiolítico o sedante en la medicina tradicional de Cunduacán, no sería contradictorio. La teobromina presenta diversas actividades farmacológicas importantes, a parte de la neuroprotectora, como es la capacidad de inhibir la formación de piedras en los riñones, mediante la inhibición de la cristalización del ácido úrico y estimulación de la diuresis (Zhang et al., 2024), por lo que las flores de cacao podrían contar con otras formas de aplicaciones terapéuticas interesantes.

7.4 Evaluación de la actividad antioxidante

En la tabla 4 se muestran los resultados del % de inhibición del radical DPPH de los extractos etanólicos (EE), metanólicos (EM) y diclorometánicos (EDC) de flores y semillas de *Theobroma cacao* a diferentes concentraciones (1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.06 mg/mL y 0.03 mg/mL.). De manera general se puede observar que los extractos que mostraron un mayor % de inhibición al radical DPPH (%IRD) fueron, los extractos metanólicos de flores y semillas en concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL, el extracto etanólico de flores de 1 mg/mL, así como el extracto metanólico de semillas a 0.125 mg/mL, y , 0.06 mg/mL, todos con % de inhibición mayores al 80%. Además, se puede observar que de los 36 extractos evaluados 35 tuvieron un % de inhibición del radical DPPH mayor al 10% y 33 extractos un % de inhibición del radical DPPH mayor al 30%.

Tabla 4. Porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH

EXTRACTO/CONCENTRACIÓN	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
E. ETANÓLICO FLORES	84.98	63.33	52.54	41.22	34.05	30.22
E. ETANÓLICO SEMILLAS	50.65	40.07	40.93	11.00	20.14	0
E. METANÓLICO FLORES	89.93	90.47	90.75	77.06	58.39	44.19
E. METANÓLICO SEMILLAS	89.46	89.75	90.25	90.25	82.19	55.09
E. DICLOMETANICO FLORES	35.91	41.61	38.67	35.41	38.78	37.31
E. DICLOTOMETÁNICO	37.81	35.59	41.15	39.35	35.99	35.30

En la figura 26 se puede observar que las primeras tres concentraciones de los extractos metanólicos de flores y semillas fueron las que presentaron mayor % de inhibición del radical DPPH y no tuvieron diferencias significativas entre sí. Se observa que a pesar de que el extracto etanólico de flores sin diluir tuvo % IRD mayor al 84%, este presentó una diferencia significativa con respecto a los extractos con mayor % IRD en esta prueba. De igual manera, con las respectivas diluciones de este extracto las actividades disminuyeron su capacidad de manera estadísticamente significativa. Asimismo, se puede observar que los extractos que tuvieron menor % IRD fueron los extractos etanólicos de semillas a sus diferentes concentraciones y los extractos diclorometánicos tanto de flores como de semillas, los cuales no tuvieron diferencias significativas entre sí en las diferentes concentraciones.

Parte importante de la composición de las semillas de cacao en peso seco son los compuestos polifenólicos. Estos compuestos tienen un amplio potencial como antioxidantes (Carrillo et al, 2014; Martín & Ramos, 2021), por lo cual se ha conferido esta misma propiedad a las semillas. Estos compuestos también han sido encontrados en partes de la planta como hojas y cáscara, que también demostraron tener actividad antioxidante (Fernández-Romero et al., 2020; Soares & Oliviera, 2022; Younes et al., 2023).

En el presente estudio se demostró que los extractos etanólicos, metanólicos y diclorometánicos de flores secas de *T. cacao* también poseen actividad antioxidante a diferentes concentraciones por medio del método de DPPH.

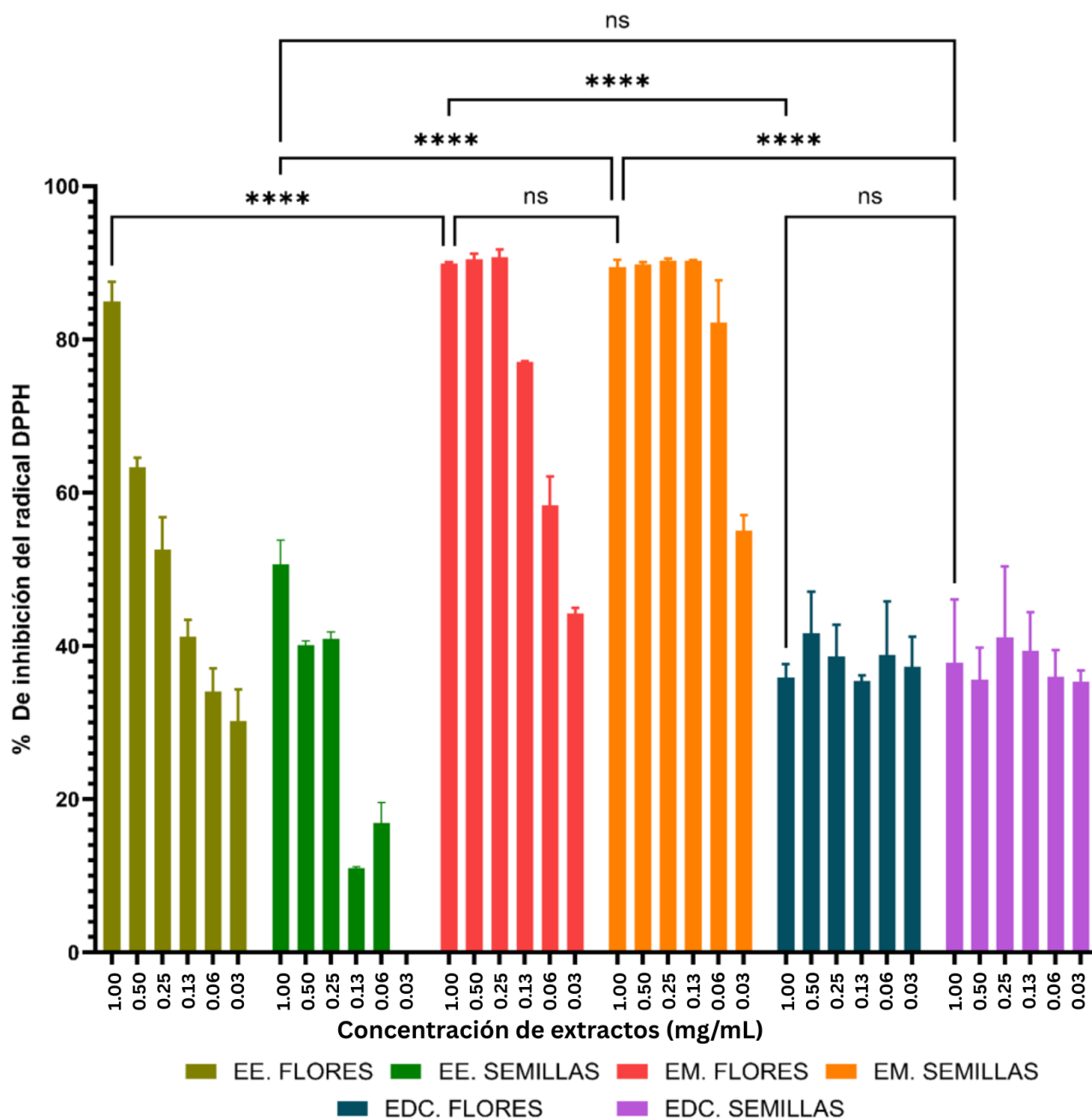


Figura 26. % de inhibición del radical DPPH: EE (extracto etanólico), EM (extracto metanólico) y EDC (extracto diclorometánico) a diferentes concentraciones.

Los polifenoles son moléculas con de alta polaridad, por ello se puede deducir que en los extractos etanólicos y metanólicos de flores y semillas pudieran contenerlas, confiriéndoles importante actividad antioxidante. A pesar de que no se encuentran estudios de este tipo específicos para las flores de *T. cacao*, en el presente trabajo,

donde se obtuvieron los perfiles cromatográficos en capa fina de los diferentes extractos de flores, se pudieron observar manchas con las características de compuestos de tipo fenólico, por lo cual podemos deducir que la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, metanólicos y de los extractos de flores de *T. cacao* pudieran ser atribuidos a este tipo de compuestos. Además, Sanbongi et al, (1998) evaluó la capacidad antioxidante de algunos polifenoles de *T. cacao* y determinó que una de las principales moléculas con capacidad antioxidante en sistemas hidrofóbicos fue la clovamida, un derivado del ácido cafeico, que pertenece a las fenolamidas (amidas del ácido hidroxicinámico) (Kolodziejczyk-Czepas, 2024), por lo cual podríamos inferir que podría ser una de las moléculas antioxidantes presentes en los extractos diclorometánicos de esta investigación.

Como ya se ha mencionado en estudios anteriores, la identificación de la capacidad antioxidante de los extractos de flores y semillas de *T. cacao* provenientes de Cunduacán Tabasco, nos da indicios sobre los efectos benéficos a la salud que pudiesen tener estos extractos, como lo son efectos en el sistema nervioso central, cardiovasculares, antienvjecimiento, antitumorales o incluso anticancerígenos.

7.5 Evaluación de la actividad ansiolítica y sedante

En diferentes investigaciones que han tenido como objetivo evaluar el potencial ansiolítico de extractos de especies vegetales por medio de la prueba del Laberinto de la cruz elevada (LCE). Específicamente con cacao, en estudios realizados por Yamada et al. (2009) se determinó que el consumo de cacao por ratones durante dos semanas aumentó la concentración de neurotransmisores serotonina y dopamina, a su vez demostraron que después de consumo inmediato de pasta de cacao se disminuían los comportamientos relacionados a la ansiedad en el modelo de LCE.

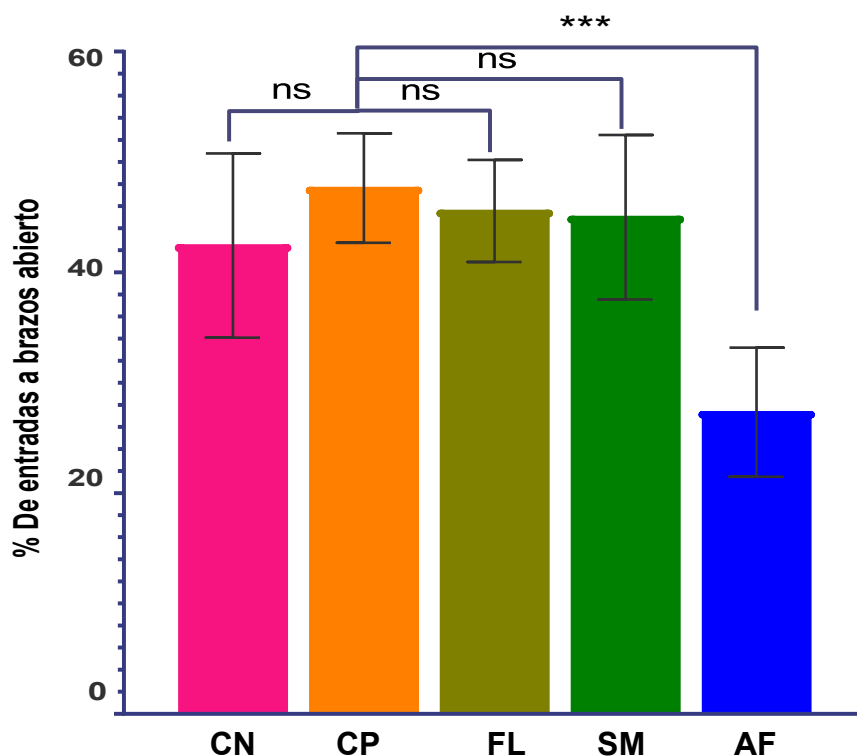


Figura 27. Porcentaje de entradas a los brazos abiertos. CN (control negativo), CP (control positivo), FL (extracto etanólico de flores), SM (extracto etanólico de semillas) y AF (extracto acuoso de flores).

En esta investigación los resultados obtenidos por medio de los ensayos de LCE demostraron que con respecto al porcentaje de entradas a los brazos abiertos (fig. 27) no existe diferencia significativa entre el grupo control positivo (CP) suministrado con diazepam y los grupos de extracto etanólico de semillas (SM), extracto etanólico de flores (FL) y control negativo (CN). Se observa que los ratones de estos cuatro grupos solo entraron en promedio (40-50%) de las veces a los brazos abiertos del LCE, por lo tanto, el aproximadamente 60% de las veces prefirieron entrar a los brazos cerrados del laberinto. Los ratones administrados con el extracto acuoso de flores (AF) tuvieron menor tendencia a entrar a los brazos abiertos en comparación con los ratones del grupo CP.

Sin embargo, en la figura 28 se puede observar que en comparación con los ratones grupo CP suministrados con diazepam si existe diferencia significativa entre en porcentaje de tiempo que los ratones de los grupos CN, FL, SM Y AF pasaron dentro de los brazos abiertos, siendo que los ratones del grupo CP estuvieron aproximadamente el 57% del tiempo en los brazos abiertos del LCE en comparación con los ratones de los grupos FL, SM y AF, los cuales pasaron en promedio 21, 18 y 10% del tiempo en los brazos abiertos el laberinto respectivamente.

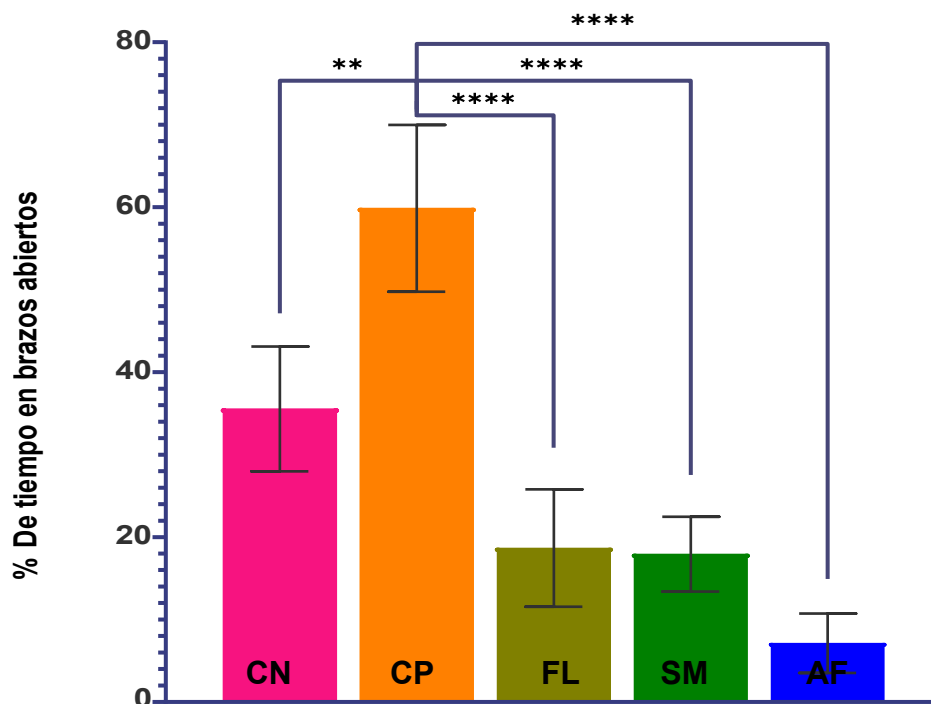


Figura 28. Porcentaje de tiempo en brazos abiertos. CN (control negativo), CP (control positivo), FL (extracto de flores), SM (extracto de semillas) y AF (extracto acuoso de flores).

Los resultados de la prueba de tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico se presentan en la figura 29. La actividad sedante de los extractos se determinó por su capacidad de prolongar significativamente el tiempo de sueño inducido respecto al grupo control negativo, criterio establecido como estándar para la evaluación farmacológica de la actividad sedante e hipnótica de extractos vegetales en este modelo (Fernández et al., 2005).

Los resultados demostraron que los tres extractos de *T. cacao* evaluados prolongaron significativamente el tiempo de sueño inducido respecto al grupo control negativo (CN). El extracto etanólico de flores (FL) aumentó el tiempo de sueño en 11.2 min respecto al CN, el extracto etanólico de semillas (SM) lo prolongó en 14.0 min, y el extracto acuoso de flores (AF), preparado según el protocolo tradicional de

los médicos de la cultura maya Yokot'an, mostró la mayor potenciación entre los extractos con una diferencia de 26.4 min respecto al CN. El control positivo (CP) produjo la mayor prolongación del sueño con una diferencia de 42.8 min respecto al CN. Los resultados demuestran que el extracto acuoso de flores (AF) alcanzó el 61.7% de la potenciación sedante producida por el diazepam, mientras que FL y SM alcanzaron el 26.2% y el 32.7%, respectivamente.

Con base en estos resultados, se sugiere que la prolongación significativa del tiempo de sueño observada en los grupos FL, SM y AF de los extractos de *T. cacao* podría deberse a que contienen compuestos que pudieran actuar de manera sinérgica con el sistema GABAérgico o bien de interactuar con otro sistema de neurotransmisión implicado en la regulación del sueño.

En el presente trabajo, la infusión acuosa de flores de *T. cacao* preparada mediante el protocolo tradicional de los médicos de la cultura maya Yokot'an produjo la mayor potenciación del sueño entre los extractos evaluados, lo que respalda parcialmente el uso etnobotánico de esta preparación como tranquilizante.

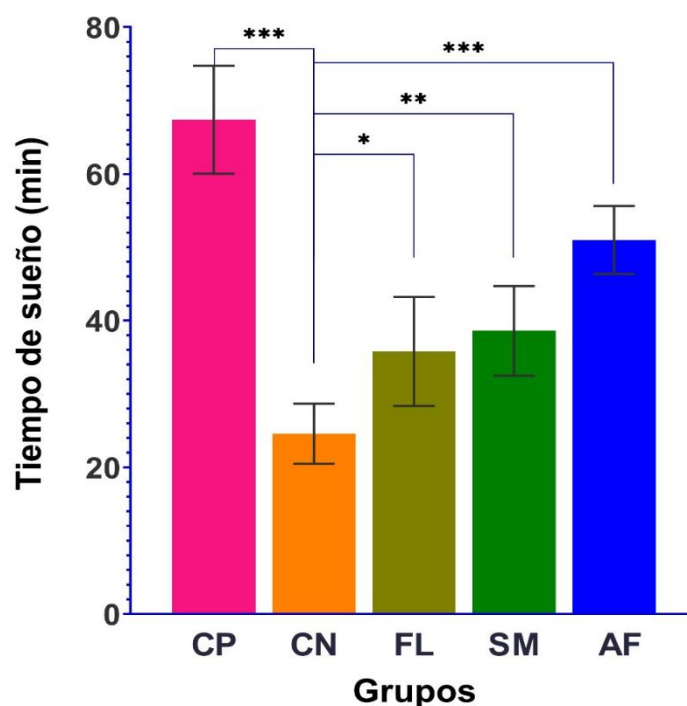


Figura 29. Tiempo de sueño inducido con pentobarbital. CN (control negativo), CP (control positivo), FL (extracto de flores), SM (extracto de semillas) y AF (extracto acuoso de flores).

En conjunto, los resultados obtenidos a partir de los modelos neurofarmacológicos empleados en el presente estudio ofrecen un panorama diferenciado sobre el potencial biológico de los extractos etanólicos de flores y

semillas de *T. cacao* sobre el sistema nervioso central. Por un lado, ninguno de los extractos evaluados demostró actividad ansiolítica estadísticamente significativa a la dosis estudiada mediante el modelo del laberinto en cruz elevada, por lo que la hipótesis de trabajo no se confirma para este efecto a las condiciones estudiadas. Por otro lado, los tres extractos evaluados; etanólico de flores (FL), etanólico de semillas (SM) y acuoso de flores (AF) prolongaron significativamente el tiempo de sueño inducido por pentobarbital respecto al control negativo ($p=0.029$, $p=0.006$ y $p<0.0001$, respectivamente), lo que constituye evidencia de actividad sedante estadísticamente significativa en los extractos de *T. cacao* a la dosis estudiada.

La ausencia de actividad ansiolítica en el modelo de LCE no necesariamente descarta la existencia de compuestos con este potencial en la planta. La presencia de las metilxantinas cuantificadas en los extractos etanólicos, específicamente teobromina ($4.17 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y cafeína ($0.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) en flores, podrían ser un factor de confusión relevante, ya que estos compuestos antagonizan los receptores de adenosina incrementando el estado de alerta y vigilia (Martínez-Pinilla et al., 2015), lo que podría haber contrarrestado cualquier efecto ansiolítico ejercido por otros fitoquímicos del extracto.

Es importante tomar en consideración que sería importante evaluar, en futuros trabajos de investigación, las fracciones con diferentes disolventes obtenidas del extracto de flores; así como realizar otra recolección en una localidad distinta, ya que el contenido de metabolitos en la planta podría variar. También queda la posibilidad de analizar diferentes variedades de cacao, así como ampliar el muestreo del material recolectado. De igual manera se puede considerar que en el presente modelo de estudio se consideró animales murinos, por lo que quedaría la posibilidad de que una evaluación clínica podría alojar resultados distintos.

8. CONCLUSIONES

- Durante el proceso natural de transformación de los frutos de *T. cacao*, que empiezan desde el brote de la flor hasta la obtención de la semilla deshidratada, la concentración de la molécula característica de esta especie (teobromina) aumenta en aproximadamente 18 veces para las variedades propias de la zona de muestreo de acuerdo con el análisis realizado por medio de CLAE.
- Los compuestos predominantes en los extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao*, así como de sus diferentes fracciones pudieran ser principalmente terpenos, terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos glicosilados.
- Los extractos etanólicos, metanólicos y diclorometánicos de flores y semillas de *T. cacao* provenientes de Cunduacán Tabasco poseen la capacidad de inhibir el radical DPPH, siendo los metanólicos de ambas partes vegetales en concentración de 1:1 los que tuvieron mayor potencial antioxidante, con porcentajes de inhibición superiores al 89%, lo que sugiere una alta concentración de compuestos polares con actividad antirradicalaria en esta especie.
- El extracto acuoso de flores, así como los extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* provenientes del estado de Tabasco no poseen actividad ansiolítica o cuando esta se evalúa por medio de la prueba de LCE.
- El extracto acuoso de flores, así como los extractos etanólicos de flores y semillas de *T. cacao* provenientes del estado de Tabasco demostraron actividad sedante al prolongar el tiempo de sueño inducido por pentobarbital respecto al control negativo, siendo el extracto acuoso (AF) el de mayor actividad sedante entre los extractos evaluados aumentando el tiempo de sueño 26.4 minutos. No obstante, el efecto sedante de todos los extractos evaluados fue significativamente inferior al producido por el diazepam.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar las fracciones individuales en diferentes modelos farmacológicos.
- Caracterización fitoquímica de las fracciones con mejor actividad biológica.
- Ampliar el muestreo de flores a otras localidades y variedades de cacao permitiría determinar si la actividad biológica observada es consistente o depende del genotipo y el ambiente.
- Complementar el ensayo de DPPH con métodos como ABTS o FRAP, y cuantificar fenoles/flavonoides totales para complementar los ensayos de actividad antirradicalaria.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjaloo, M. K., Oduro, W., & Banful, B. K. (2012). Floral Phenology of Upper Amazon Cocoa Trees: Implications for Reproduction and Productivity of Cocoa. *ISRN Agronomy*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.5402/2012/461674>

Araque, O., R. E. Jaimez, W. Tezara, I. Coronel, R. Urich, & W. Espinoza (2012). «comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars *Theobroma cacao*) during dry and wet seasons». *Experimental Agriculture* 48(4):513-22. [doi:10.1017/S0014479712000427](https://doi.org/10.1017/S0014479712000427).

Arnold, Sarah E. J., Samantha J. Forbes, David R. Hall, Dudley I. Farman, Puran Bridgemohan, Gustavo R. Spinelli, Daniel P. Bray, Garvin B. Perry, Leroy Grey, Steven R. Belmain, & Philip C. Stevenson (2019). «Floral Odors and the Interaction between Pollinating Ceratopogonid Midges and Cacao». *Journal of Chemical Ecology* 45(10):869-78. [doi:10.1007/s10886-019-01118-9](https://doi.org/10.1007/s10886-019-01118-9).

Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>

Baharum, Zainal, Abdah Akim, Yun Taufiq-Yap, Roslida Hamid, & Rosmin Kasran (2014). «In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of *Theobroma cacao*». *Molecules* 19(11):18317-31. [doi:10.3390/molecules191118317](https://doi.org/10.3390/molecules191118317).

Balderas, Gema S., Raúl E. Alcalá, Anabel Ortiz-Caltempa, Alexandre Cardoso-Taketa, & María Luisa Villarreal. (2020). «Variation in the Production of Sedative and Anxiolytic Compounds Among *Galphimia* Sp. Populations Grown in a Greenhouse». *Revista Brasileira de Farmacognosia* 30(1):99-102. [doi:10.1007/s43450-020-00010-y](https://doi.org/10.1007/s43450-020-00010-y).

Ballesteros, Possu W. (2011). «CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ÁRBOLES ELITE DE CACAO». Universidad de Nariño, Colombia.

Ballinas, M., & O. López (2016). «Materiales de cacao de interés farmacológico (*Theobroma cacao* L.)». *Revista Espacio I+D Innovación más Desarrollo* 5(11):84-103. [doi:10.31644/IMASD.11.2016.a05](https://doi.org/10.31644/IMASD.11.2016.a05).

Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00291-1)

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). [36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 343-355). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)

Cadoná, F. C., Dantas, R. F., De Mello, G. H., & Silva-Jr, F. P. (2022). Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(26), 7222-7241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913091>

Cardoso-Taketa, Alexandre, Rogelio Pereda-Miranda, Young Choi, Robert Verpoorte, &

María Villarreal. (2008) «Metabolic Profiling of the Mexican Anxiolytic and Sedative Plant *Galphimia Glauca* Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Data Analysis». *Planta Medica* 74(10):1295-1301. [doi:10.1055/s-2008-1074583](https://doi.org/10.1055/s-2008-1074583).

Carr, M. K. V., & Lockwood, G. (2011). The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.): A review. *Experimental Agriculture*, 47(4), 653–676. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000421>

Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>

Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite Storage in *Theobroma cacao* L. Seed: Cyto-Histological and Phytochemical Analyses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1599. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01599>

Chumacero De Schawe, Claudia, Michael Kessler, Isabell Hensen, & Teja Tschardt (2018). «Abundance and Diversity of Flower Visitors on Wild and Cultivated Cacao (*Theobroma cacao* L.) in Bolivia». *Agroforestry Systems* 92(1):117-25.

Cruz, A. P. M., F. Frei, & F. G. Graeff (1994) «Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49(1):171-76. [doi:10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3).

Cruz-Pérez Alejandra, L., Barrera-Ramos, J., Bernal-Ramírez Luis, A., Bravo-Avilez, D., & Rendón-Aguilar, B. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y>

Cuatrecasas, Jose. (1964). «Cacao and Its Allies, a Taxonomic Revision of the Genus *Theobroma*.” in Systematic Plant Studies». Pp. 379-614 en *Contribution from the United States National Herbarium*. Vol. 36. Washington, DC: Smithsonian Institution.

De Melo, C. W. B., Bandeira, M. D. J., Maciel, L. F., Bispo, E. D. S., De Souza, C. O., & Soares, S. E. (2020). Chemical composition and fatty acids profile of chocolates produced with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. *Food Science and Technology*, 40(2), 326-333. <https://doi.org/10.1590/fst.43018>

Dillinger, T. L., Barriga, P., Lowe, D. S., & Grivetti, L. E. (2000). Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine. *American Society for Nutritional Sciences*, 2057-2072.

Dostert, Nicolas, Jose Roque, Asunción Cano, María I. La Torre, & Maximilian Weigend. (2012). *Hoja botánica cacao: Theobroma cacao* L. 1.^a ed. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

E. Grivetti. (2000). «Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate». *The Journal of Nutrition* 130(8):2057S-2072S. [doi:10.1093/jn/130.8.2057S](https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2057S).

Erickson, B. J., Young, A. M., Strand, M. A., & Erickson, E. H. (1987). Pollination biology

of Theobroma and Herrania (Sterculiaceae): II. Analyses of floral oils. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(03), 301-310. <https://doi.org/10.1017/S1742758400005282>

Erjon, Putri, W. N., & Rikmasari, Y. (2017). Efek Sedatif Ekstrak Etanol Umbi Wortel (*Daucus carota* L.) pada Mencit Putih Jantan Galur Swiss-Webster. *Journal Ilmiah Bakti Farmasi*, 2(2), 17-26.

Fernández, S. P., Wasowski, C., Paladini, A. C., & Marder, M. (2005). Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.039>

Galano, A., Mazzone, G., Alvarez-Diduk, R., Marino, T., Alvarez-Idaboy, J. R., & Russo, N. (2016). Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 335-352. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033206>

Fernández-Romero, E., Chavez-Quintana, S. G., Siche, R., Castro-Alayo, E. M., & Cardenas-Toro, F. P. (2020). The Kinetics of Total Phenolic Content and Monomeric Flavan-3-ols during the Roasting Process of Criollo Cocoa. *Antioxidants*, 9(2), 146. <https://doi.org/10.3390/antiox9020146>

Fernández, S. P., Wasowski, C., Paladini, A. C., & Marder, M. (2005). Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.039>

Fideles, S. O. M., Ortiz, A. D. C., Reis, C. H. B., Buchaim, D. V., & Buchaim, R. L. (2023). Biological Properties and Antimicrobial Potential of Cocoa and Its Effects on Systemic and Oral Health. *Nutrients*, 15(18), 3927. <https://doi.org/10.3390/nu15183927>

Galletero, J. Mariano, José Guimón, Enrique Echeburúa, & Luis González de la Rivera. (1989). «Etiología de la ansiedad». *Monografías de psiquiatría* 1(4).

Ganem, J. L. (2022). *Diagnóstico del Mercado del Cacap en México 2022*. Fine Cacao and Chocolate Institute (FCCI). https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00ZWQD.pdf

Giacometti, Jasminka, Slavica Mazor Jolić, & Djuro Josić. (2015). «Cocoa Processing and Impact on Composition». Pp. 605-12 en *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic Press.

Gutiérrez, S. L. G., Chilpa, R. R., & Jaime, H. B. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591-608. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.007>

Ha, L. T. V., Hang, P. T., Everaert, H., Rottiers, H., Anh, L. P. T., Dung, T. N., Phuoc, P. H. D., Toan, H. T., Dewettinck, K., & Messens, K. (2016). Characterization of leaf, flower, and pod morphology among vietnamese cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) *Pakistan Journal of Botany*, 48(6), 2375-2386.

Hayden, M., Stewart, E. C., Almatani, M. F., Case, J., Rice, S., Rompato, G., Hintze, K. J., & Benninghoff, A. (2025). Cocoa Polyphenols Modulate the Mouse Gut Microbiome in a Site-Specific Manner. *Nutrients*, 17(17), 2876. <https://doi.org/10.3390/nu17172876>

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Reviews Inc*, 16, 33-50.

Hartley, N., & McLachlan, C. S. (2022). Aromas Influencing the GABAergic System. *Molecules*, 27(8), 2414. <https://doi.org/10.3390/molecules27082414>

Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., & Yoshida, T. (2002). Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, 59(7), 749-758. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00051-1)

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

Hii, C. L., C. L. Law, S. Suzannah, & M. Cloke. (2009). «Polyphenols in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2(4):702-22.

Holanda, D. K. R., Wurlitzer, N. J., Dionisio, A. P., Campos, A. R., Moreira, R. A., Sousa, P. H. M. de, Brito, E. S. de, Ribeiro, P. R. V., Iunes, M. F., & Costa, A. M. (2020). Garlic passion fruit (*Passiflora tenuifila* Killip): Assessment of eventual acute toxicity, anxiolytic, sedative, and anticonvulsant effects using in vivo assays. *Food Research International*, 128, 108813. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108813>

INEGI. 2021. *Resultados de la primera encuesta nacional de bienestar autorreportado (enbiare) 2021*. 772/21.

INEGI. 2022. *Aspectos geográficos Tabasco 2021*

INIFAP. 2021. *La Producción del cacao en México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

INEGI. (2022). *Anuario estadístico y geográfico de Tabasco 2022*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Katzung & Trevor. 2022. «Fármacos sedantes-hipnóticos.» en *Farmacología*. McGraw Hill.

Kolodziejczyk-Czepas, J. (2024). Clovamide and Its Derivatives—Bioactive Components of *Theobroma cacao* and Other Plants in the Context of Human Health. *Foods*, 13(7), 1118. <https://doi.org/10.3390/foods13071118>

Kim, H., & Keeney, P. G. (1984). (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, 49(4), 1090-1092. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10400.x>

Llamasares-Castillo, A., Villaflores, O., Kuroki, Y., Wada, A., Zhu, X., Cabatit, K. A., Garcia, J. J., Martin, J., & Vasquez, R. (2025). Phytotherapeutic agents for insomnia: A scoping review on the mechanistic insights and evidence from animal models. *Phytomedicine Plus*, 5(2), 100770. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100770>

Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G., & Cappellano, G. (2007). Determination of

Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 45(5), 273-275. <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.5.273>

Martin, M. Á., & Ramos, S. (2021a). Impact of cocoa flavanols on human health. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112121. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112121>

Martínez-Hernández, Gabriela Belen, Enrique Jiménez-Ferrer, Manases González-Cortazar, Rubén Román-Ramos, Jaime Tortoriello, Gabriela Vargas-Villa, & Maribel Herrera-Ruiz. (2021). «Antidepressant and Anxiolytic Compounds Isolated from *Salvia Elegans* Interact with Serotonergic Drugs». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 394(12):2419-28. [doi:10.1007/s00210-021-02155-6](https://doi.org/10.1007/s00210-021-02155-6).

Martínez-Hernández, M. D. J., Torres-Pelayo, V. R., & Castillo-Rocha, D. G. (2022). Traditional Medicine in the health systems of communities: A first exploring in Veracruz State, Mexico. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 7(5), 052-069. <https://doi.org/10.22161/ijeab.75.6>

Martínez-Pinilla, E., Oñatibia-Astibia, A., & Franco, R. (2015). The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00030>

Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, P. A. Lopez, C. F. Ortiz, A. Moreno, & C. Lanaud. (2002). «Cacao Domestication I: The Origin of the Cacao Cultivated by the Mayas». *Heredity* 89(5):380-86. [doi:10.1038/sj.hdy.6800156](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156).

Organización Mundial de la Salud. 2022. *Trastornos mentales*.

Ortiz, Anabel, Alexandre Cardoso-Taketa, Mario Monroy, Jesús Arellano, Georgina Hernández, & María Villarreal. (2010). «Transformed Cell Suspension Culture of *Galphimia Glauca* Producing Sedative Nor-Friedelanines». *Planta Medica* 76(04):386-92. [doi:10.1055/s-0029-1186166](https://doi.org/10.1055/s-0029-1186166).

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H., & Kondo, K. (2001). Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radical Research*, 34(1), 93-99. <https://doi.org/10.1080/10715760100300091>

Osakabe, N., Yamagishi, M., Sanbongi, C., Natsume, M., Takizawa, T., & Osawa, T. (1998). The Antioxidative Substances in Cacao Liquor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44(2), 313-321. <https://doi.org/10.3177/jnsv.44.313>

Pase, Matthew P., Andrew B. Scholey, Andrew Pipingas, Marni Kras, Karen Nolidin, Amy Gibbs, Keith Wesnes, & Con Stough. (2013). «Cocoa Polyphenols Enhance Positive Mood States but Not Cognitive Performance: A Randomized, Placebo-Controlled Trial». *Journal of Psychopharmacology* 27(5):451-58. [doi:10.1177/0269881112473791](https://doi.org/10.1177/0269881112473791).

Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*. 41. 128-134.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Reus I.V. 2022. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21.^a ed. McGraw Hill.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

Romero, Hernández Esteban. 2016. «Evaluación ecomorfológica de cacao (*Theobroma cacao* L) sometido a distintas fertilizaciones, en la comunidad de Nuevo Ojita, municipio de Papantla, Ver.» Universidad Veracruzana.

Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998). Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 454-457. <https://doi.org/10.1021/jf970575o>

Sathyapalan, Thozhukat, Stephen Beckett, Alan S. Rigby, Duane D. Mellor, & Stephen L. Atkin. (2010). «High Cocoa Polyphenol Rich Chocolate May Reduce the Burden of the Symptoms in Chronic Fatigue Syndrome». *Nutrition Journal* 9(1):55. doi: [10.1186/1475-2891-9-55](https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-55).

Saunders, P. A., Ito, Y., Baker, M. L., Hume, A. S., & Ho, I. K. (1990). Pentobarbital tolerance and withdrawal: Correlation with effects on the GABAA receptor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37(2), 343-348. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90346-J](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90346-J)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). «Anuario estadístico de la producción agrícola». https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/

Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules*, 27(5), 1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>

Sokolov, Alexander N., Marina A. Pavlova, Sibylle Klosterhalfen, & Paul Enck. (2013). «Chocolate and the Brain: Neurobiological Impact of Cocoa Flavanols on Cognition and Behavior». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37(10):2445-53. [doi:10.1016/j.neubiorev.2013.06.013](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.013).

Sotelo, A., & Alvarez, R. G. (1991). Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11), 1940-1943. <https://doi.org/10.1021/jf00011a009>

Sotelo C., L., Alvis B., A., & Arrázola P., G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>

Stepherson, F., Anne. 1995. «Review article: The GABA_A RECEPTORS». *Biochemistry Journal* 310:1-9.

Szuhany, Kristin L., & Naomi M. Simon. (2022). «Anxiety Disorders: A Review». *JAMA*

328(24):2431. [doi:10.1001/jama.2022.22744](https://doi.org/10.1001/jama.2022.22744)

Pura Naik, J. (2001a). Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3579-3583. <https://doi.org/10.1021/jf000728z>

Pucciarelli, D. L., & Grivetti, L. E. (2008). The Medicinal Use of Chocolate in Early North America. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(10), 1215-1227. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700264>

Tadeo-Sánchez, José Manuel, & Jessica Mariela Tolentino-Martínez. (2020). «El cacao Grijalva de Tabasco: dinámicas socio territoriales en torno a su producción Tabasco». *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional* 30(56). [10.24836/es.v30i56.1002](https://doi.org/10.24836/es.v30i56.1002).

Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00138-X)

Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules*, 22(8), 1369. <https://doi.org/10.3390/molecules22081369>

Vignes, Michel, Tangui Maurice, Fabien Lanté, Magali Nedjar, Karen Thethi, Janique Guiramand, & Max Récasens. (2006). «Anxiolytic Properties of Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin Gallate (EGCG)». *Brain Research* 1110(1):102-15. [10.1016/j.brainres.2006.06.062](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.062).

Waizel, BJ. 2006. *Las Plantas medicinales y las ciencias: una visión multidisciplinaria*. México: Instituto Politécnico Nacional.

Yamada, T., Yamada, Y., Okano, Y., Terashima, T., & Yokogoshi, H. (2009). Anxiolytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(12), 948-955. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.08.007>

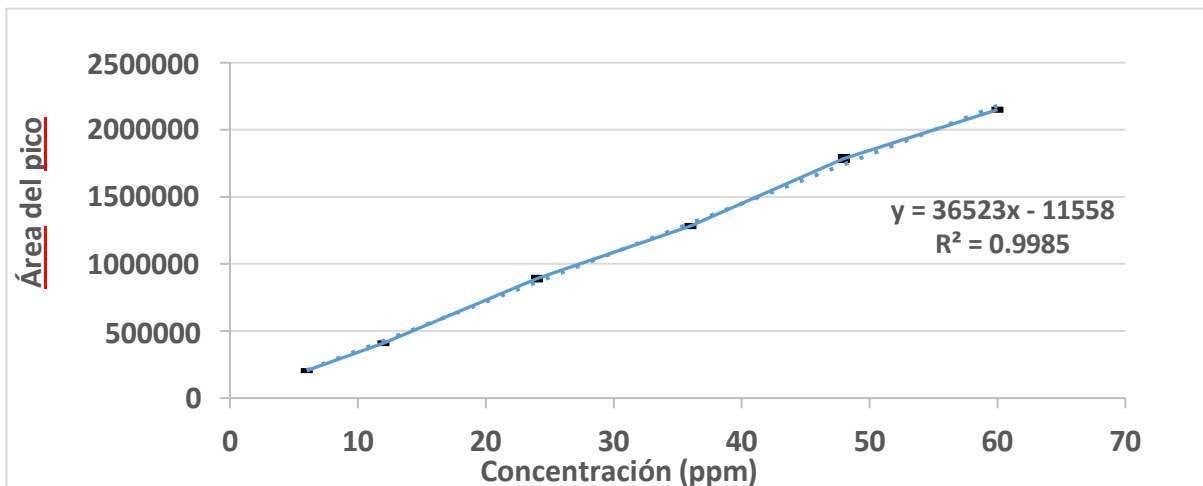
Yoneda, M., Sugimoto, N., Katakura, M., Matsuzaki, K., Tanigami, H., Yachie, A., Ohno-Shosaku, T., & Shido, O. (2017). Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.002>

Younes, A., Li, M., & Karboune, S. (2023). Cocoa bean shells: A review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance their potential applications in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(28), 9111-9135. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2065659>

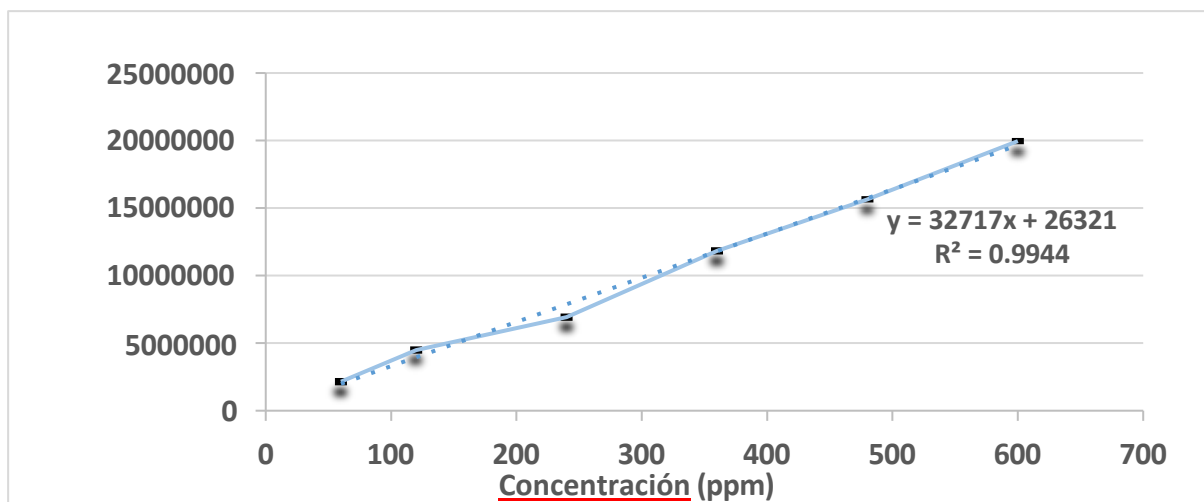
Young, Allen M & David W. Severson. (1994). «Comparative Analysis of Steam Distilled Floral Oils of Cacao Cultivars (*Theobroma Cacao* L., Sterculiaceae) and Attraction of Flying Insects: Implications for A *Theobroma* Pollination Syndrome». *Journal of Chemical Ecology* 20(10):2687- 2703. [doi:10.1007/BF02036201](https://doi.org/10.1007/BF02036201).

Zhang, M., Zhang, H., Jia, L., Zhang, Y., Qin, R., Xu, S., & Mei, Y. (2024). Health benefits and mechanisms of theobromine. *Journal of Functional Foods*, 115, 106126.

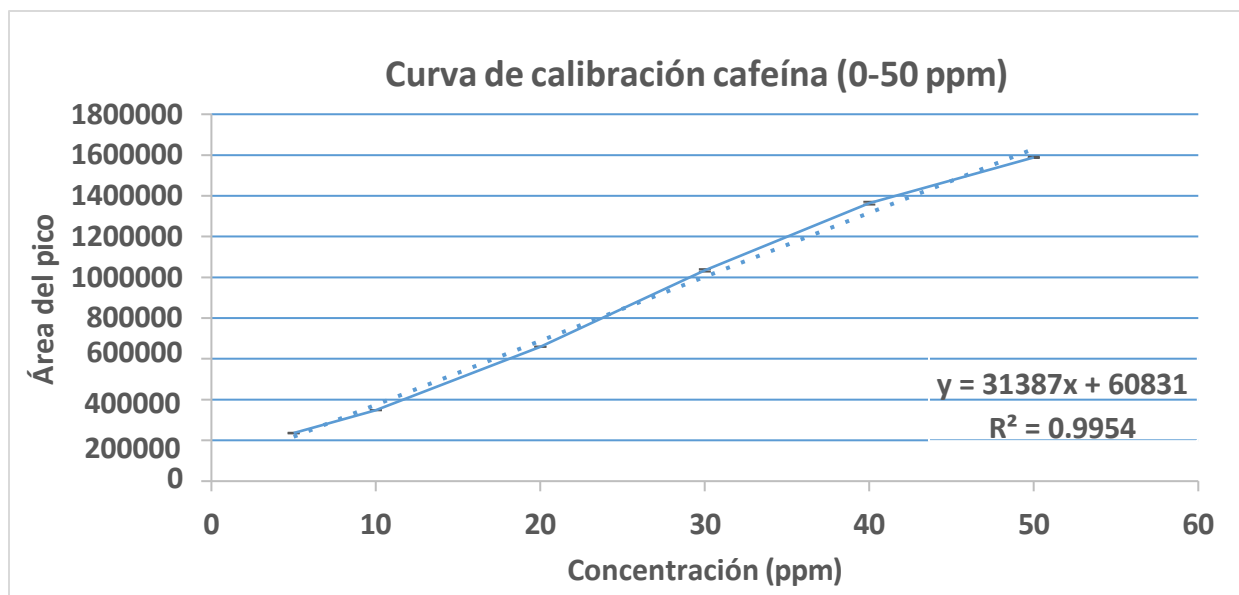
11. ANEXOS



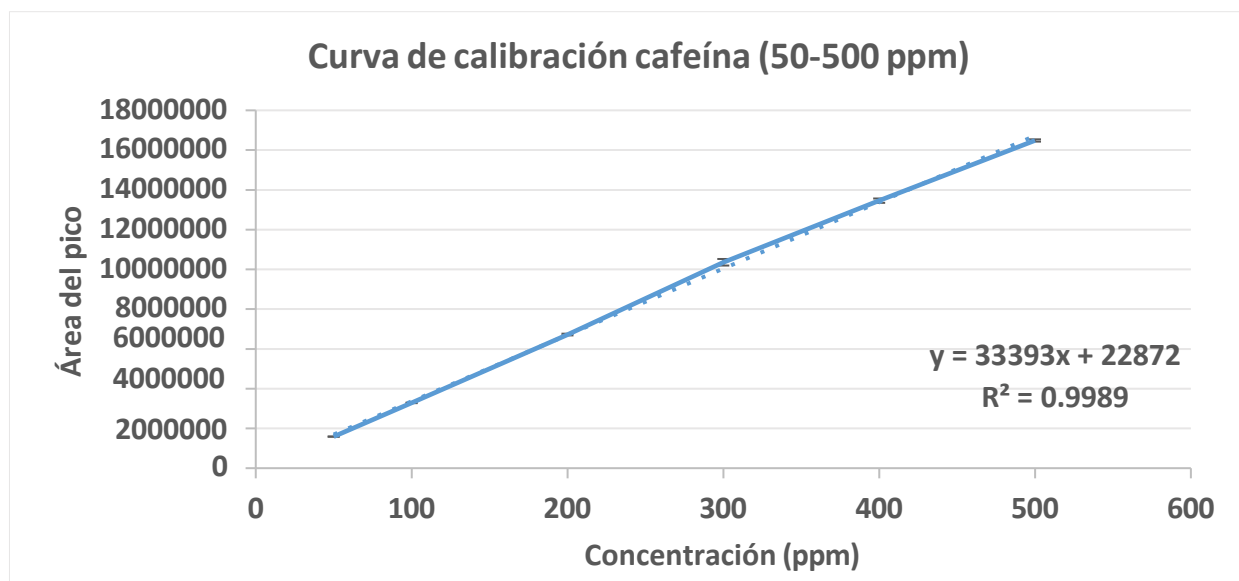
Anexo 1: Curva de calibración del estándar de teobromina (0-60 ppm)



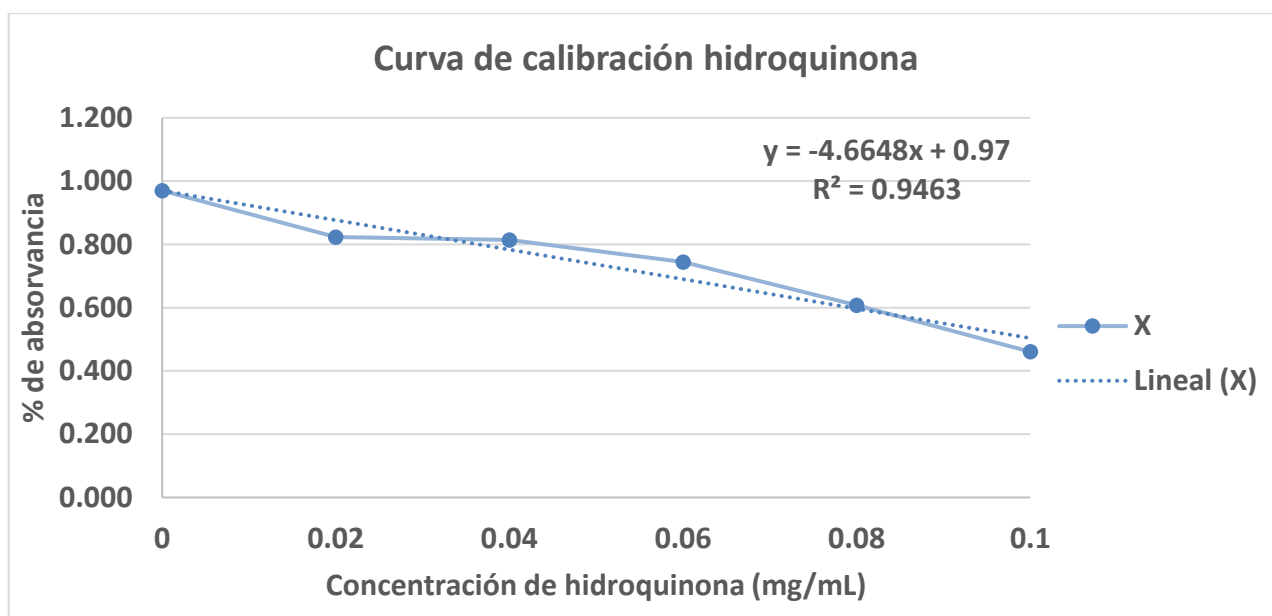
Anexo 2: Curva de calibración del estándar de teobromina (60-600 ppm)



Anexo 3: Curva de calibración del estándar de cafeína (0-50 ppm)



Anexo 4: Curva de calibración del estándar de cafeína (50-500 ppm)



Anexo 5: Curva de calibración de hidroquinona (0-0.1 mg/mL)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Morelos, 8 de junio de 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“Evaluación de las actividades antioxidante, ansiolítica y sedante de extractos de flores de *Theobroma cacao* L. del municipio de Cunduacán Tabasco.”** que presenta la C. **Coral García Mora** del Programa de Posgrado Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales, bajo la dirección del **Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA (CEIB-UAEM)

DRA. GISELLE TAMAYO CASTILLO (CRIPRONA, UNIVERSIDAD DE COSTA RICA)

DR. FERNANDO CUEVAS REMIGIO (CEIB-UAEM)

DR. NAHIM SALGADO MEDRANO (FCB, UAEM)

MTRA. MONICA MORALES AGUILAR (CEIB-UAEM)



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,
Torre de Laboratorios CEIB, Tel. (777) 329 7057 ceib@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

Sello electrónico

MONICA MORALES AGUILAR | Fecha: 2026-06-09 13:16:06 | FIRMANTE

PWCK/VfFOCV7vznVN948JgeYy+hTd8xJGlvs1SPiFiZovVYrOkz1Bcno9tPqmOzuNuFY0DvXTvGj0pPoFsj5ID0KNBv8KmDGIzMIjY9y2ODSYr0qkjuTeJGYq4fuk6r7ZbcKbSd3B36YMDgMpwuUHFUu61RQTX2N+YJM4b4Ce64zBOSUOMCga+nUJhf8uemRpn/h3bdYRmnCwykh6Nxx5XYMknP0PpFI74BzGPjejqgUJeW496hycDOH1qIA9RfkM/cAwrcFYp eOIFGaBwzn1ZTK74DZ5wK6tL5HDQdWY0G855oprCzMCGEchq5YDbw0x2ITajMZHg4FLYuh6Tg==

GISELLE TAMAYO CASTILLO | Fecha: 2026-06-09 13:24:25 | FIRMANTE

RYfthLbcMYMSEU74pVy4CchaN6ezuoNM9+cgvZwsddc5mAqusJxjphnd18a3MMA9PYmKKwE39gkfCKZ16jneTZxl8ytDsXbzanyGRMVy2sfyX++H7VF3rgX64jXR4TZS9Cc4jE6F asyx+hUIGeLij5HxirbNlkXucd3189wS2xgRFHO/1ThOSLLKq+mS0/+K23kacva4OihTytbQ7vYuv4z8Env84UnF9VCXpUcVpxwY33sJrwHBFEnl3/n6LzzLTzsdnc/A8PN4pKCqB/B pD8HoQsX/EHbFyRWcen9Fq3SGVU8IRAPewpvLSyifjclvq0ZUq4uGG6rWYrtqz28A==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha: 2026-06-09 14:48:08 | FIRMANTE

AdqA0D9ls3f/PPQkp5TyGsAbOrulTQh1aahd484jKjArzcBwB6PdOSqjY5oZybCwflH2tOAvcQC+K1imDYbraNqNv4Qq4vSOvtiYflsH7rbiZShw+1zQ8Eq4W/DEOt8zRc+93USxPiO6 cWdL13xIVpPhCvZlr4h019s49TSyrQ0LxdPHrDibit4GQyEffJvOOPWPm1S80d5UrrEuWQ1LsO6OfyJ1Uf9+ETPGOOV9Lvk9Hrc1l/qTGhQWjvDdgyudSLNuU1GOWLpjm4VzX1n BzWzo0krzHRQ8PqrBo1F+LCOq0mHLdMEZ/YBNzcbZc2vtoeeWnxMmDBP0u6Gv50i+Zw==

FERNANDO CUEVAS REMIGIO | Fecha: 2026-06-09 16:04:23 | FIRMANTE

e0hdzW41MzMOOq8zNaktDsP5iFxoRAqovj8DpdPw3sHGKjAGXrieknZmmQlOoG4h1ZRW+E7goMFBqbpT7G4tvjxuTlligb1k5r0/NJXbdOgD5xaKjS5F6AiDYnjHqFhlxT/lwJCY bh6Z3wz0xGHhhHPi2DGil/dfyfYivghhNNeXf9uQWVZSPJAoYpwoM/rcyzyZx9QxGCWVZ68adcatD5ilOri8Zhnv1550xU2cNCI8jaZQYRE7atwi+qbEPT82qpodQrMsdKkK9vI/KFbJ GuHalv5523lXjI77OZoljdIE7wAGhCphtMmCHCU6tVlbgCDC93CGicUcFFdA==

NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha: 2026-06-10 11:11:44 | FIRMANTE

Fplikt9fJY0URnYhaYZiAtpO9SfMyL4NQYfG1o701LvEajYGXisi9+D0IDCkmpI6IKuJ12Sjdn+ItKcOHE+YR9bN+P1mGpZXz7E5GeaaUHM3W3Pk6EgF/rJwHaW21vzY6JND5 2N0sYym6eGPmW667iCWWhU59g9oKrr1ftqsGge+eI9T2hKIE3sQ/OzbJPupyz2Zu9o2O6sE4DnQKSAzpD9lbYyC7lw3Y6qxaRqLfYVPsf+pKL4qQFKUaKP6/78//2ZEfDXX3vB/vczK 5CBmESkAgQGrzTxwLbCTSiCsRmObvTtRizNAUhA3ZJo9nW8sQNI3ZjztK3PX8yWzqw==

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



iFt8KXqHo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5HdrgL0j1WxTjFZle13IRwxSKPXa6d8x>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029