UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Volatiloma y capacidad antioxidante de la resina de *Croton lechleri* bajo diferentes etapas de desarrollo, Cotundo, Ecuador.

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: KENNY GABRIEL MUYOLEMA YUQUILEMA

TUTOR: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN

COTUTOR: PhD. KAREL DIÉGUEZ SANTANA

Tena - Ecuador

2026

Carrera de Biotecnología

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 19 de agosto de 2026

De mi consideración:

Yo, Kenny Gabriel Muyolema Yuquilema con documento de identidad 1550251944, declaró que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

KENNY GABRIEL MUYOLEMA YUQUILEMA

Firmado digitalmente por KENNY GABRIEL MUYOLEMA YUQUILEMA
Fecha: 2026.08.19 21:07:00 -05'00'

Kenny Gabriel Muyolema Yuquilema

CI: 1550251944

Carrera de Biotecnología

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Tena, 19 de agosto de 2026

Yo, Kenny Gabriel Muyolema Yuquilema, con documento de identidad 1550251944 en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Volatiloma y capacidad antioxidante de la resina de *Croton lechleri* bajo diferentes etapas de desarrollo, Cotundo, Ecuador.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Atentamente,

KENNY GABRIEL MUYOLEMA YUQUILEMA

Firmado digitalmente por KENNY GABRIEL MUYOLEMA YUQUILEMA
Fecha: 2026.08.19 21:06:12 -05'00'

Kenny Gabriel Muyolema Yuquilema
CI: 1550251944

Carrera Ingeniería en Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 19 de agosto de 2026

Certifico que el trabajo de titulación: “Volatiloma y capacidad antioxidante de la resina de *Croton lechleri* bajo diferentes etapas de desarrollo, Cotundo, Ecuador.”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de: tesis, fue realizado por Kenny Gabriel Muyolema Yuquilema, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON

Tutora
PhD. Noroska Gabriela Salazar Mogollón
C.I: 1757494453

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
KAREL DIEGUEZ SANTANA

Cotutor
PhD. Karel Dieguez Santana
C.I: 1756444129

DEDICATORIA

A mis padres, Hernán Muyolema y Rosa Yuquilema, por ser el cimiento de todo lo que soy, por cada sacrificio silencioso que hicieron sin esperar nada a cambio, por cada madrugada que enfrentaron con valentía para darnos un mejor futuro y por cada palabra de aliento que me sostuvieron en los momentos en que las fuerzas querían faltar; a mis hermanos Jinson y William, por su compañía incondicional, por las risas compartidas en los momentos más difíciles y por recordarme siempre que no importa cuán largo sea el camino, nunca lo recorrería solo; y a mi primo Stalin Hidalgo, quien con su ejemplo de vida, sus palabras oportunas y su fe inquebrantable en mí nunca me dejó rendirme, motivándome a seguir adelante cuando el camino parecía demasiado cuesta arriba. Todo lo que hoy puedo llamar logro lleva el nombre de cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTO

Agradezco enormemente a mi tutora Noroska Gabriela Salazar Mogollón PhD y a mi cotutor PhD. Karel Diéguez Santana, quienes desde el primer momento depositaron su confianza en mí, guiaron cada etapa de este proceso investigativo con dedicación y paciencia, y me brindaron las herramientas académicas y científicas necesarias para llevar este trabajo a buen término. Su compromiso con la investigación y con la formación de sus estudiantes ha sido una fuente constante de inspiración y aprendizaje. Asimismo, extiendo mi más sincero agradecimiento a mi mentor Ing. Jefferson Pastuña, por su acompañamiento cercano, sus consejos y su disposición permanente para orientarme en los momentos en que más lo necesité. De igual manera, agradezco profundamente al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por facilitar el espacio, los equipos y los recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación, y a todo su personal por la colaboración y el apoyo técnico brindado durante el proceso experimental. A cada uno de ellos, gracias por creer en este proyecto y en mí.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD..... ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN..... iv
DEDICATORIA..... v
AGRADECIMIENTO..... vi
TABLA DE CONTENIDO..... vii
ÍNDICE DE TABLAS..... ix
ÍNDICE DE FIGURAS..... x
RESUMEN..... xi
ABSTRACT..... xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN..... 1
1.1 **Antecedentes**..... 1
1.2 **Planteamiento del problema a investigar**..... 3
1.3 **Justificación de la investigación**..... 3
1.4 **Objetivos de la investigación**..... 4
1.4.1 ***Objetivo general***..... 4
1.4.2 ***Objetivos específicos***..... 4
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA..... 6
2.1 **Recolección de Muestras de *Croton lechleri***..... 6
2.2 **Análisis de compuestos volátiles por Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas acoplada al espacio de cabeza (HS-GC-MS)**..... 7
2.2.1 ***Preparación de Muestras***..... 7
2.2.2 ***Configuración del Cromatógrafo Gaseoso Acoplado a Espectrometría de Masas (HS-GC-MS)***..... 7
2.3 **Evaluación de la Capacidad Antioxidante de la Sangre de Drago mediante el Ensayo ABTS (Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolil) -6-sulfónico)**..... 8
2.3.1 ***Preparación de extracto vegetal***..... 8
2.3.2 ***Preparación de la muestra***..... 9

2.3.3 ***Preparación de la curva de calibración trolox***..…….. 9
2.3.4 ***Preparación del radical ABTS***…… 10
2.3.5 ***Análisis de las muestras***…….. 10
2.4 **Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**..……. 11
2.5 **Análisis Estadístico**…… 12
CAPÍTULO III: RESULTADOS…….. 13
3.1 **Caracterización del volatiloma de *C. lechleri***…….. 13
3.2 **Análisis de Componentes Principales (PCA) del Volatiloma de la resina de *C. lechleri***…….. 19
3.3 **Análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) y mapa de calor del volatiloma**……. 20
3.4 **Actividad antioxidante de los extractos acuosos de la resina de *C. lechleri***……..... 22
3.6 **Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**…… 26
3.7 **Comparación integrada de los métodos ABTS y DPPH**……. 29
3.8 **Correlación - Caracterización química / actividad antioxidante**..... 30
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN……. 32
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES…… 37
5.1 **Conclusiones**…….. 37
5.2 **Recomendaciones**……. 38
REFERENCIAS
ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3 Metabolitos volátiles seleccionados identificados a Nivel 2 y Nivel 3 mediante análisis HS-GC-MS en la resina de C. lechleri. RI Exp.: índice de retención experimental; RI Lit.: índice de retención de la literatura; ΔRI: diferencia absoluta entre ambos índices; Score: similitud espectral(%)..... 13

Tabla 2-3 Capacidad antioxidante total (TAC, mmol Trolox/g extracto seco) de la resina de C. lechleri determinada por el método ABTS, organizada por etapa de desarrollo y árbol..... 24

Tabla 3-3. Análisis de varianza (ANOVA tipo I) de la capacidad antioxidante total medida por el método ABTS en la resina de C. lechleri según etapa de desarrollo..... 25

Tabla 4-3. Capacidad antioxidante total (TAC, mmol Trolox/g extracto) de la resina de C. lechleri determinada mediante el método DPPH. R1, R2 y R3 corresponden a las réplicas analíticas de cada árbol; DE: desviación estándar de las réplicas por árbol. La media global representa el promedio por etapa de desarrollo..... 27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3. Plano principal del PCA del volatiloma de la resina de *C. lechleri* en función de la etapa de desarrollo. Envejecidos (círculos rojos), adultos (cruces moradas),jóvenes (cuadrados azules),QC = controles de calidad (triángulos verdes). PC1 explica el 23.82 % y PC2 el 18.50% de la varianza total…….. 20

Figura 2-3. Mapa de calor de los metabolitos identificados en la resina de *C. lechleri* en función de la etapa de desarrollo, organizado mediante HCA. La escala de color refleja la abundancia relativa autoscalada (azul intenso = baja abundancia; rojo intenso = alta abundancia). Adultos, envejecidos, jóvenes. Las letras a, b y c indican los tres clústeres principales de metabolitos con patrones de abundancia diferenciados entre etapas……. 22

Figura 3-3. Curva de calibración del estándar trolox para el ensayo ABTS de la actividad antioxidante…….. 23

Figura 4-3. Actividad antioxidante de *C. lechleri* mediante el ensayo ABTS. Valores expresados como media ± desviación estándar…….. 26

Figura 5-3. Curva de calibración del estándar Trolox para el ensayo DPPH de la actividad antioxidante…… 27

Figura 6-3. Capacidad antioxidante total de los extractos de resina de *C. lechleri* evaluada mediante el ensayo DPPH…… 29

RESUMEN

El presente estudio determinó el perfil de compuestos volátiles (volatiloma) y la capacidad antioxidante de la resina de *Croton lechleri* en tres etapas de desarrollo (joven, adulta y envejecida) recolectadas en Cotundo, provincia de Napo, Ecuador. La caracterización del volatiloma se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con extracción por espacio de cabeza (HS-GC-MS). Se detectaron 94 picos cromatográficos, de los cuales 70 alcanzaron un nivel de certeza 2. Los principales compuestos incluyeron monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados, como eucaliptol, linalol, α-pineno y γ-terpineno. Los análisis PCA y HCA evidenciaron diferencias en la composición química entre las etapas de desarrollo. Los árboles jóvenes presentaron mayor abundancia de alcoholes alifáticos y cetonas de cadena corta, mientras que los adultos y envejecidos mostraron perfiles enriquecidos en terpenos oxigenados estructuralmente complejos. La capacidad antioxidante total (TAC), evaluada mediante ABTS y DPPH, aumentó significativamente con la etapa de desarrollo (ABTS: $F = 4.87$, $p = 0.024$; DPPH: $F = 7.04$, $p = 0.007$). Los árboles adultos y envejecidos presentaron mayor TAC que los jóvenes, sin diferencias significativas entre ambos. Estos resultados indican que la etapa de desarrollo influye en la calidad química de la resina y sugieren priorizar árboles adultos para su aprovechamiento sostenible.

Palabras clave: ABTS, capacidad antioxidante, *Croton lechleri*, HS-GC-MS, volatiloma

ABSTRACT

This study determined the volatile compound profile (volatilome) and antioxidant capacity of *Croton lechleri* resin at three developmental stages (young, adult, and aged) collected in Cotundo, Napo Province, Ecuador. Volatilome characterization was performed using headspace gas chromatography coupled with mass spectrometry (HS-GC-MS). A total of 94 chromatographic peaks were detected, of which 70 reached confidence level 2. Predominant compounds included oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes, such as eucalyptol, linalool, α-pinene, and γ-terpinene. PCA and HCA revealed differences in chemical composition among developmental stages. Young trees showed higher abundances of aliphatic alcohols and short-chain ketones, whereas adult and aged trees exhibited profiles enriched in structurally complex oxygenated terpenes. Total antioxidant capacity (TAC), evaluated using ABTS and DPPH assays, increased significantly with developmental stage (ABTS: $F = 4.87$, $p = 0.024$; DPPH: $F = 7.04$, $p = 0.007$). Adult and aged trees showed significantly higher TAC than young trees, with no significant differences between them. These findings indicate that developmental stage influences resin chemical quality and suggest prioritizing adult trees for sustainable resin harvesting and improved utilization. The results provide relevant information for understanding chemical variation in *C. lechleri* resin and support its potential as a source of bioactive compounds.

Keywords: ABTS, antioxidant capacity, *Croton lechleri*, HS-GC-MS, volatilome

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Ecuador, reconocido como uno de los países más megadiversos del planeta, alberga una vasta riqueza biológica que incluye una amplia variedad de especies vegetales con propiedades medicinales. Entre estas destaca el árbol *Croton lechleri*, cuya resina, conocida como sangre de drago, ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional de las regiones tropicales de América del Sur, particularmente en Ecuador, Colombia y Perú. Se le atribuyen propiedades que ayudan a la cicatrización, alivian la inflamación y combaten los efectos del envejecimiento celular, por lo que sigue siendo muy valorada por las comunidades locales (Gupta et al., 2008; Jones et al., 2003). Este líquido, con su característico color rojo intenso, tiene una composición química compleja que incluye proantocianidinas, polifenoles, alcaloides y una variedad de compuestos volátiles (De Marino et al., 2008; Milanowski et al., 2002). Estas sustancias son las responsables de sus efectos terapéuticos, y por ello, los científicos están cada vez más interesados en sus propiedades para aplicaciones médicas modernas (Bellesia et al., 1996).

La resina de *C. lechleri* contiene compuestos bioactivos volátiles como flavonoides, alcaloides y terpenos, que exhiben una potente acción antioxidante al neutralizar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo (Bellesia et al., 1996). Este mecanismo es crucial para la eficacia terapéutica de la sangre de drago en el tratamiento de diversas afecciones (Cai et al., 1991; De Marino et al., 2008). La capacidad antioxidante de la resina está asociada con la prevención de enfermedades degenerativas y crónicas, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, ya que la acumulación de radicales libres puede dañar las células y acelerar el envejecimiento. En este contexto, los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en *C. lechleri* se consideran herramientas valiosas para

combatir el daño celular y prevenir trastornos relacionados con el envejecimiento y enfermedades degenerativas (Milanowski et al., 2002).

Es interesante notar que, al igual que otras plantas medicinales, las concentraciones de los compuestos bioactivos pueden variar dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta. A medida que las plantas avanzan en su ciclo de vida, pueden producir más compuestos bioactivos como respuesta al estrés o a la necesidad de reparación celular. Diversos estudios han reportado que la edad de las plantas medicinales influye directamente en la acumulación de metabolitos secundarios, observándose diferencias importantes en especies como *Artemisia* y *Panax ginseng*, donde las variaciones entre individuos jóvenes, adultos y envejecidos modifican su actividad farmacológica y composición química (Tower & Weathers, 2015; Yuan et al., 2023).

Por lo tanto, analizar cómo las diferentes etapas fenológicas de *C. lechleri* afectan la variabilidad química de sus metabolitos secundarios permite identificar la etapa de desarrollo más adecuada para la extracción de la resina. Esto contribuiría a mejorar la calidad y la composición de los metabolitos bioactivos, asegurando mayor uniformidad y eficacia en los productos derivados, con aplicaciones específicas en las industrias farmacéutica y biotecnológica.

Las características químicas de *C. lechleri* siguen siendo objeto de estudio, especialmente en lo que respecta al perfil de componentes volátiles y semivolátiles, conocido como volatiloma, el cual contribuye a las actividades biológicas descritas. Si bien se han identificado compuestos clave mediante GC-MS, como el acetato de etilo y el propionato de etilo, responsables de su aroma característico, también han demostrado efectos beneficiosos en la cicatrización de heridas, la reducción de la inflamación y la protección celular. Estos compuestos volátiles no solo tienen propiedades antiinflamatorias, sino que también actúan como antioxidantes, lo que contribuye a prevenir el daño celular y el envejecimiento prematuro, sugiriendo su gran potencial terapéutico en diversas aplicaciones medicinales (Bellesia, Pinetti, & Tirillini, 1996). A pesar de los estudios realizados, hasta ahora no se ha considerado cómo las diferentes etapas de desarrollo de la planta afectan tanto el perfil volátil como su

capacidad antioxidante, lo cual representa una variable importante que podría influir significativamente en las propiedades terapéuticas de la resina.

1.2 Planteamiento del problema a investigar

La resina de *C. lechleri*, conocida como sangre de drago, es ampliamente utilizada en la medicina tradicional en América del Sur y se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas, destacando entre ellas sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y cicatrizantes. Estos beneficios provienen de su rica composición química, que incluye proantocianidinas, polifenoles y alcaloides (De Marino et al., 2008). Sin embargo, aún no se comprende cómo los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en la resina se ven afectados por la etapa de desarrollo del árbol, ni cómo este factor influye en su actividad antioxidante. Este desconocimiento ha dado lugar a un uso indiscriminado de *C. lechleri*, ya que, en muchas ocasiones, los extractos provienen principalmente de árboles jóvenes, mientras que se evita el uso de árboles adultos. Esto limita el aprovechamiento completo de este valioso recurso natural. La falta de un método que regule esta variabilidad impide la producción de productos de calidad constante y efectiva, lo que representa un desafío tanto para los productores como para los consumidores, especialmente en sus aplicaciones en medicina natural y cosmética.

1.3 Justificación de la investigación

La investigación sobre la resina de *C. lechleri* es esencial debido a la creciente demanda de productos naturales con propiedades terapéuticas en la medicina y la cosmética. A pesar de conocerse sus beneficios, como los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y cicatrizantes, aún existen vacíos importantes sobre cómo las etapas de desarrollo del árbol afectan la composición química de la resina, especialmente los compuestos

volátiles y semivolátiles. Esta falta de comprensión limita el aprovechamiento completo del potencial terapéutico de la resina, ya que no se sabe cómo factores como el Diámetro a la Altura del Pecho (DAP) del árbol influyen en su perfil químico, lo que a su vez afecta su actividad antioxidante y la eficacia de los productos derivados. Comprender cómo la etapa de desarrollo de *C. lechleri* impacta su perfil volátil y su actividad antioxidante es importante para optimizar la recolección y extracción de la resina, garantizando productos de alta calidad y uniformidad. Además, este estudio permitirá establecer métodos estandarizados para producir extractos más consistentes y efectivos, beneficiando tanto a los productores, al mejorar la calidad de los productos, como a los consumidores, quienes recibirán productos más seguros y eficaces. Al proporcionar una base científica para la recolección controlada de la resina, se podrá fomentar un aprovechamiento más sostenible y eficaz de este valioso recurso natural.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Determinar el perfil de compuestos volátiles y la capacidad antioxidante presentes en las muestras de *C. lechleri* bajo diferentes etapas de desarrollo.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil de compuestos volátiles presentes en muestras de *C. lechleri* por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con extracción por espacio de cabeza (HS-GC-MS).
- Evaluar la capacidad antioxidante de la resina de *C. lechleri* en cada etapa de desarrollo.

- Correlacionar a través de métodos de análisis multivariados el perfil volátil de la resina *C. lechleri* con la actividad antioxidante observada.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 Recolección de Muestras de *Croton lechleri*

La recolección de muestras de resina de *Croton lechleri* se realizó bajo el permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE-DBI-CM-2023-0310) en el Cantón Cotundo, provincia de Napo, Ecuador, en un entorno natural adecuado para el desarrollo de la especie. Las muestras fueron obtenidas en la selva húmeda, aproximadamente a 20 minutos de la comunidad de Shamato. Las coordenadas GPS, la altitud y la fecha de muestreo de cada individuo se detallan en el **Anexo 1**. La recolección se dividió en tres etapas de desarrollo de la planta: jóvenes, adultos y envejecidos. Se seleccionaron un total de seis árboles, representando las tres etapas de desarrollo de la especie (joven, adulta y envejecida). En la recolección de muestras de los árboles jóvenes, se obtuvieron tres muestras provenientes de dos árboles distintos como de muestra en el **Anexo 2**. De manera similar, en la recolección de muestras de los árboles adultos, se extrajeron tres muestras de dos árboles diferentes. En los árboles envejecidos, se obtuvieron dos muestras de dos individuos distintos. El diámetro a la altura del pecho (DAP) se midió a 1.3 metros sobre el nivel del suelo y los diámetros correspondientes a cada etapa de desarrollo de los árboles se presentan en el **Anexo 3.** Se realizaron laceraciones superficiales en la corteza de los troncos a una altura de entre 1 y 2 metros, seleccionada como la zona más idónea para obtener resina de alta calidad y minimizar el daño al árbol. La resina recolectada fue acumulada en recipientes plásticos estériles, colocados en la parte baja de los troncos hasta que el flujo de resina se detuviera. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio herméticamente sellados a 4°C para preservar su integridad y evitar la pérdida de compuestos volátiles. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para su posterior análisis.

2.2 Análisis de compuestos volátiles por Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas acoplada al espacio de cabeza (HS-GC-MS)

2.2.1 Preparación de Muestras

El análisis de compuestos volátiles se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con espacio de cabeza (HS-GC-MS); para ello, en viales de 2 mL se añadieron 0.5 mL de resina de *C. lechleri* , los cuales fueron homogeneizados con 1.5 mL de agua tipo I hasta alcanzar un volumen final de 2.0 mL por vial; adicionalmente, se prepararon controles de calidad (QC) a partir de una alícuota de cada réplica biológica (417 µL de resina), homogeneizada en 10 mL de agua tipo I, los cuales fueron analizados después de cada cinco inyecciones de muestras a lo largo del lote analítico con el fin de evaluar la reproducibilidad y estabilidad del sistema; finalmente, para la determinación de los índices de retención (RI) de los compuestos volátiles presentes en las muestras de *C. lechleri* , se utilizó una mezcla estándar de *n*-alcanos (C8–C20), analizada bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras.

2.2.2 Configuración del Cromatógrafo Gaseoso Acoplado a Espectrometría de Masas (HS-GC-MS)

La configuración del HS-GC-MS se realizó utilizando un sistema HS-GC-MS con un cromatógrafo GC-2030 (Shimadzu) y un espectrómetro de masas GCMS-QP2020 NX Series (Shimadzu). El gas portador utilizado fue helio, y la inyección se realizó en modo splitless, con una temperatura de inyección de 150 °C, una presión de 49.5 kPa, un flujo total de 6.0 mL/min y un flujo de columna de 1.00 mL/min. El tiempo de muestreo fue de 1 minuto y el flujo de purga se estableció en 3.0 mL/min. La columna cromatográfica utilizada fue una SH-RTX-5Sil-MS con una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de fase estacionaria de 0.25 µm. El horno de la columna fue

programado para iniciar a 40 °C, luego aumentando a 8 °C/min hasta 150 °C y finalmente a 15 °C/min hasta 240 °C, donde se mantuvo durante 1.25 minutos. La fuente de ionización por impacto de electrones (EI) se programó a una temperatura de 230 °C, mientras que la temperatura de la interfase fue de 150 °C. La adquisición de datos se realizó en modo Scan en un rango de masas de 32–550 m/z. La identificación del perfil químico de las muestras de *C. lechleri* se llevó a cabo utilizando las herramientas especializadas MS-DIAL, MZmine, eRah y MShub. Los datos exportados por los programas detallados anteriormente fueron cargados en NIST MS Search 2.4, del cual se extrajeron parámetros críticos como el índice de retención experimental, el índice de retención de la literatura y la similitud espectral (Aksenov et al., 2021; Smirnov et al., 2019).

2.3 Evaluación de la Capacidad Antioxidante de la Sangre de Drago mediante el Ensayo ABTS (Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolil)-6-sulfónico)

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de *C. lechleri*, se recolectaron muestras de 6 árboles. De cada muestra, se extrajo 0,5 mL por triplicado.

2.3.1 Preparación de extracto vegetal

Se colocaron 0,5 mL de cada muestra y se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL, se procedió a pesar las muestras, la masa de cada muestra se encuentra en **Anexo 4**. Posteriormente, se añadió 1 mL de metanol al 96 % a cada tubo para facilitar la extracción de los compuestos antioxidantes presentes en la sangre de drago según Escobar et al. (2018).

Las muestras fueron agitadas en un vortex durante 1 minuto para asegurar una mezcla homogénea. Luego, se sometieron a un tratamiento ultrasónico de 5 minutos,

repitiendo este proceso hasta completar 30 minutos para liberar los compuestos bioactivos, tal como se describe en Escobar et al. (2018).

Una vez finalizado el tratamiento ultrasónico, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante de los residuos sólidos. El sobrenadante, con un volumen aproximado de 1 mL, fue cuidadosamente extraído y transferido a nuevos tubos Eppendorf, los cuales fueron pesados previamente para verificar la correcta recuperación del extracto. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en un concentrador rotatorio a vacío durante 5 horas para eliminar el metanol, obteniendo un concentrado seco listo para el análisis. La masa de los extractos obtenidos se registró en **Anexo 5**.

2.3.2 Preparación de la muestra

Del extracto seco obtenido, se midió 5 mg de muestra en tubos Eppendorf, el cual se disolvió con 1000 µL de metanol, para finalmente aforar en un balón de 10 mL con etanol al 96 %, logrando una concentración final de 0.5 mg/mL. Para disolver la muestra se realizó vortex por 1 minuto, seguido de ultrasonido por 5 minutos. Usando la solución anterior, se preparó una disolución de 0.02 mg/mL para llevar a cabo el ensayo de capacidad antioxidante ABTS.

2.3.3 Preparación de la curva de calibración trolox

La solución madre de trolox para la curva de calibración se preparó disolviendo 2.5 mg de trolox (pureza 99.2 %) en un balón volumétrico de 10 mL con etanol al 96 %, obteniendo una concentración de 1000 µM. Esta solución fue usada para preparar 5 niveles de la curva de calibración 10, 40, 80, 120 y 160 µM. Estas concentraciones fueron seleccionadas para asegurar el rango lineal de la curva de calibración. La curva de

calibración generada permitió correlacionar las concentraciones de trolox con la capacidad antioxidante medida a través de la inhibición del radical ABTS, según Escobar et al. (2018).

2.3.4 Preparación del radical ABTS

El radical ABTS se preparó disolviendo 3.9 mg de ABTS (pureza 98 %) en 1 mL de una solución de persulfato de amonio (5.7 mg de persulfato de amonio de pureza 98 % fue disuelto en agua ultrapura y aforado en un balón de 10 mL), la mezcla se homogeneizó mediante vortex. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente, protegida de la luz, durante 12 horas para permitir la formación del radical libre.

Una vez formado el radical ABTS, se preparó la solución de trabajo, para ello, se disolvió 625 µL de la solución de radical ABTS en un balón volumétrico de 100 mL, y se aforó con etanol al 96 % hasta alcanzar el volumen final de 100 mL. Para proteger al radical de la degradación por la luz, la solución se almacenó en un recipiente color ámbar. La absorbancia máxima del radical ABTS fue medida a 734 nm, valor utilizado para determinar su capacidad antioxidante en las pruebas posteriores.

2.3.5 Análisis de las muestras

La actividad antioxidante se midió utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Para ello, se prepararon dos tubos de ensayo, uno con 2 mL de la solución radical ABTS y el otro con 100 µL del extracto de sangre de drago. Los tubos se dejaron reposar en oscuridad durante 15 minutos para permitir que el radical libre reaccionara con el extracto. Después de este tiempo, las soluciones fueron transferidas a cubetas de cuarzo para su medición en el espectrofotómetro. El espectrofotómetro se ajustó para medir la absorbancia a 411 nm, que corresponde a la máxima absorbancia del radical ABTS, y 751

nm, que se utilizó para compensar las interferencias de fondo en la medición (Escobar et al. 2018).

2.4 Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se prepararon soluciones de DPPH y Trolox con las siguientes concentraciones: 2 mg de DPPH (equivalente a 1014.4 µM) y 6.3 mg de Trolox (equivalente a 2.5 mM). Ambos compuestos se disolvieron en 2 mL de etanol al 96 %, agitando en un vortex durante 1 minuto y luego sometiéndolos a un tratamiento ultrasónico de 3 minutos para asegurar una disolución completa.

La solución de DPPH se diluyó en un balón volumétrico de 100 mL y se aforó con etanol al 96 % hasta alcanzar el volumen final de 100 mL. Para la curva de calibración, se disolvieron 6.3 mg de Trolox (equivalente a 2.5 mM) en un balón volumétrico de 10 mL, y se aforó con etanol al 96 %. A partir de esta solución madre, se prepararon disoluciones de Trolox en etanol con las siguientes concentraciones finales (µM): 301.2, 200.0, 100.0, 71, y 50.0 µM.

Para medir la actividad antioxidante, se prepararon tubos de ensayo en los cuales se colocaron 900 µL de la solución de radical DPPH y 100 µL de la muestra. Las mezclas se dejaron reposar durante 30 minutos en la oscuridad para permitir que el radical reaccionara con el antioxidante. Posteriormente, la absorbancia se midió a 517 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, valor donde el radical DPPH muestra su máxima absorbancia, tal como se describe en Molole et al. (2022).

2.5 Análisis Estadístico

Todos los análisis (ABTS, DPPH y GC-MS) se realizaron por triplicado, y los resultados se presentaron como media ± desviación estándar. Las diferencias significativas entre las muestras se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA de tipo I), seguido de la prueba post hoc HSD de Tukey, indicándose con letras minúsculas diferentes cuando $p < 0.05$. Las correlaciones entre los ensayos y la abundancia de metabolitos se examinaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). La significación estadística de cada correlación se evaluaron con una prueba bilateral, y los valores *p* se ajustaron para comparaciones múltiples utilizando el método de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini-Hochberg. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (versión 4.4.0).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Caracterización del volatiloma de *C. lechleri*

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con extracción por espacio de cabeza (HS-GC-MS) permitió identificar un total de 94 picos cromatográficos en las muestras de resina de *C. lechleri*. Aplicando los criterios de similitud espectral (score ≥ 70 %) y un delta de índice de retención (ΔRI ≤ 10 unidades) respecto a los valores reportados en la literatura, se identificaron 70 metabolitos a nivel de certeza 2 y 24 a nivel 3, siguiendo los criterios propuestos por Sumner et al. (2007). Los compuestos de nivel 2 incluyen principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y cetonas, mientras que los de nivel 3 comprende compuestos cuya clase química fue determinada con menor certeza estructural (**Tabla 1**).

Tabla 1 . Metabolitos volátiles seleccionados identificados a Nivel 2 y Nivel 3 mediante análisis HS-GC-MS en la resina de *C. lechleri*. RI Exp.: índice de retención experimental; RI Lit.: índice de retención de la literatura; ΔRI: diferencia absoluta entre ambos índices; Score: similitud espectral (%).

Nivel	RT	RI Exp.	RI Lit.	ΔRI	Score	Nombre del metabolito
2	3.290	747	743	4	931	1-Metilpirrol
2	3.468	759	763	4	721	Metil 2-hidroxipropionato
2	3.620	769	774	5	730	Piruvato de etilo
2	3.886	793	788	5	722	2,3-Butanodiol
2	4.390	823	815	8	737	Actilol
2	5.110	868	868	0	865	1-Hexanol
2	5.490	892	891	1	890	2-Heptanona
2	5.642	902	900	2	920	2-Heptanol

2	5.772	909	909	1	783	3-Metil-2-hexanol
2	6.170	930	929	1	938	Origaneno
2	6.313	938	937	1	927	α-Pineno
2	6.430	944	950	6	830	7,7-Dimetil-2-metilenenorbornano
2	6.600	953	952	1	944	Canfeno
2	7.020	976	974	2	921	Biciclo[3.1.0]hexano, 4-metileno-1-(1-metiletil)-
2	7.128	982	979	3	934	β-Pineno
2	7.330	993	991	2	946	β-Mirceno
2	7.495	1002	998	4	825	2-Octanol
2	7.627	1008	1009	1	753	(+)-4-Careno
2	7.710	1013	1008	5	868	Benceno, 1-metoxi-2-metil-
2	7.858	1021	1017	4	914	α-Terpineno
2	8.002	1028	1025	3	932	p-Cimeno
2	8.033	1030	1030	0	871	Etilhexanol
2	8.093	1033	1031	2	839	β-Felandreno
2	8.098	1033	1031	2	876	D-Limoneno
2	8.156	1036	1032	4	931	Eucaliptol
2	8.159	1036	1033	3	753	1,7-Octadieno, 3-metileno-
2	8.420	1050	1049	1	910	trans-β-Ocimeno
2	8.661	1062	1060	2	940	γ-Terpineno
2	8.934	1077	1074	3	849	Óxido de linalol
2	9.236	1092	1088	4	892	Terpinoleno

2	9.249	1093	1090	3	803	p-Cimeneno
2	9.398	1101	1099	2	944	Linalol / 2,6-Dimetil-2,7-octadien-6-ol
2	9.689	1117	1119	2	860	1,3,8-p-Mentatrieno
2	9.736	1119	1116	3	754	exo-Fenchol
2	10.162	1142	1147	5	789	1,2,3,4,5,8-Hexahidronaftaleno
2	10.243	1146	1143	3	842	Sabinol
2	10.357	1152	1145	7	851	Alcanfor
2	10.430	1156	1148	8	849	Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 2,3,3-trimetil-
2	10.735	1173	1170	3	919	Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimetil-, (1S-endo)-
2	10.939	1184	1182	2	829	3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)-, (R)-
2	11.167	1196	1190	6	911	L-α-Terpineol
2	11.173	1196	1197	1	766	Ciclohexanol, 1-metil-4-(1-metiletilideno)-
2	11.290	1203	1195	8	744	Mirtenol
2	11.500	1214	1210	4	735	Undecano, 2,6-dimetil-
2	12.936	1295	1294	1	834	2-Undecanona
2	13.050	1302	1295	7	754	3-Ciclohexen-1-etanol, β,4-dimetil-
2	13.090	1304	1299	5	731	Fenol, 2-metil-5-(1-metiletil)-
2	13.800	1348	1350	2	789	Acetato de α-terpinilo
2	14.016	1361	1351	10	736	α-Cubebeno
2	14.460	1389	1390	1	823	β-Cubebeno
2	14.586	1396	1395	1	875	2-Dodecanona

2	14.660	1401	1406	5	740	Isocariofileno
2	14.950	1424	1420	4	756	Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano, 1,7-dimetil-7-(4-metil-3-pentenil)-, (–)-
2	15.117	1436	1435	1	811	Bergamoteno
2	15.230	1445	1448	3	753	Isogermacreno D
2	15.247	1446	1446	0	777	Biciclo[3.1.1]heptano, 6-metil-2-metileno-6-(4-metil-3-pentenil)-, [1R-(1α,5α,6β)]-
2	15.390	1458	1461	3	736	Aloaromadendreno
2	15.565	1471	1464	7	758	Ácido butanoico, 3-metil-, éster 1-etenil-1,5-dimetil-4-hexenilo / isovalerato de linalilo
2	15.663	1479	1477	2	814	γ-Muuroleno
2	15.758	1486	1485	1	751	Naftaleno, 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-
2	15.814	1490	1491	1	762	1,3,6,10-Dodecatetraeno, 3,7,11-trimetil-, (Z,E)-
2	15.970	1503	1503	0	787	Isodauceno
2	16.060	1511	1508	3	806	α-Farneseno
2	16.139	1518	1509	9	762	β-Bisaboleno
2	16.160	1520	1512	8	721	2-Metilbutanoato de bornilo
2	16.340	1537	1538	1	809	α-Cadineno
2	16.587	1560	1563	3	900	4-Isopropil-6-metil-1-metileno-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno
2	17.050	1603	1604	1	756	Óxido de humuleno I
2	17.269	1627	1631	4	733	Epicedrol
2	17.460	1647	1642	5	721	Cubenol
2	17.505	1652	1643	9	702	Benceno, (1-propiloctil)-

3	3.271	744.701	773	28	703	DL-2,3-Butanodiol
3	3.317	748.500	645	104	714	1,2-Dimetilhidrazina
3	3.921	792.800	776	17	750	Paraldehído
3	4.030	800.938	778	23	726	3-Metil-2-pentanol
3	5.380	885.313	923	38	798	Ciclohexeno, 3-(2-propenil)-
3	5.929	916.995	-	-	842	Oxima-, metoxi-fenil-
3	6.611	953.816	-	-	706	Biciclo[2.2.2]oct-7-en-2-ona, 5-metileno-
3	7.334	992.892	1004	11	726	Ciclohexano, 1-metileno-4-(1-metiletenil)-
3	7.405	996.757	902	95	700	1H-Pirrol, 2,5-dimetil-
3	7.480	1.000.783	1141	140	703	2-Propil-1-pentanol, clorodifluoroacetato
3	11.035	1.188.740	924	265	705	Ciclohexano, (1-metiletil)-
3	11.430	1.210.393	1192	18	715	Benceno, 1,3,5-trimetil-2-(1-metiletenil)-
3	11.554	1.217.371	1228	11	806	D-Verbenona
3	14.112	1.367.080	1159	208	720	Albeno
3	15.665	1.478.765	908	571	704	Trieno de santolina
3	15.823	1.490.927	1384	107	723	α-Bourboneno
3	15.906	1.497.200	1698	201	726	2-Pentadecanona
3	15.978	1.503.519	-	-	719	(2S,4R)-p-Menta-[1(7),8]-dieno 2-hidroperóxido
3	15.979	1.503.565	1489	15	778	Biciclosesquifelandreno
3	16.074	1.512.300	-	-	707	Biciclo[5.2.0]nonano, 4-metileno-2,8,8-trimetil-2-vinil-
3	16.245	1.528.200	1471	57	701	Ciclohexano

3	16.373	1.540.100	1505	35	708	Azuleno, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metiletenil)-
3	16.693	1.569.713	1125	445	800	α-Canfolenal
3	16.779	1.577.700	1557	21	730	1,5-Ciclodecadieno, 1,5-dimetil-8-(1-metiletilideno)-, (E,E)-
3	16.981	1.596.407	1568	28	705	Octano, 3-(4-metilfenoxi)-
3	17.005	1.595.400	1581	14	743	Óxido de cariofileno
3	17.050	1.603.226	-	-	704	1,4-Metanocicloocta[d]piridazina, 1,4,4a,5,6,9,10,10a-octahidro-11,11-dimetil-, (1α,4α,4aα,10aα)-
3	17.050	1.603.800	-	-	706	3-Hexanona, 2,5-dimetil-4-nitro-
3	17.760	1.679.570	1798	118	705	7-Hexadecenal, (Z)-
3	19.447	1.887.000	1555	332	719	Ácido benzoico, éster 2-etilbutilo
3	19.535	1.898.684	1862	37	700	Éter decil-octil

Entre los compuestos identificados con mayor score de similitud y menor ΔRI se destacan el eucaliptol (ΔRI = 4, score = 931), el linalol (ΔRI = 2, score = 944), el α-pineno (ΔRI = 1, score = 927) y el γ-terpineno (ΔRI = 2, score = 940). Estos compuestos pertenecen principalmente a la superclase de hidrocarburos terpénicos y compuestos orgánicos oxigenados, que son los más representados en el volatiloma de la sangre de drago.

3.2 Análisis de Componentes Principales (PCA) del Volatiloma de la resina de *C. lechleri*

Previo al análisis multivariante, se aplicó corrección del efecto drift (deriva instrumental) mediante el paquete notame en R (versión 4.4.0). La efectividad de esta corrección fue verificada mediante la proximidad y baja dispersión de las muestras de control de calidad (QC) en el espacio del Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), las cuales se agruparon de forma compacta y claramente diferenciada de las muestras biológicas (**Anexo 6**). Este comportamiento confirma que la variación observada entre las muestras corresponde a diferencias biológicas reales y no a artefactos instrumentales, validando la calidad analítica del experimento.

El PCA del volatiloma (F**igura 1**) mostró que el primer componente principal (PC1) explicó el 23.82 % de la varianza total y el segundo componente principal PC2 el 18.50 %, acumulando entre ambos el 42.32 % de la varianza. Esta distribución es característica de datos metabolómicos no dirigidos de alta dimensionalidad, donde la varianza se distribuye entre muchos componentes. Sin embargo, el PC1 capturó la principal diferenciación entre etapas de desarrollo : las muestras de árboles jóvenes se agruparon en valores positivos del PC1 con alta dispersión en PC2, reflejando mayor variabilidad intragrupo; las muestras de árboles envejecidos se proyectaron en la región negativa del PC1 con menor dispersión, indicando mayor homogeneidad química; y los árboles adultos ocuparon una posición intermedia, sugiriendo un perfil volátil transicional.

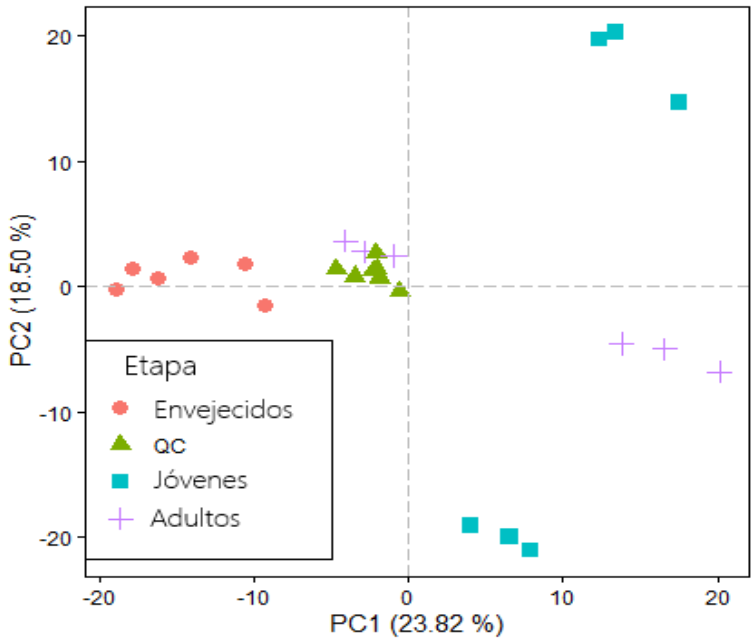


Figura 1. Plano principal del PCA del volatiloma de la resina de *C. lechleri* en función de la etapa de desarrollo. Envejecidos (círculos rojos), adultos (cruces moradas), jóvenes (cuadrados azules), QC = controles de calidad (triángulos verdes). PC1 explica el 23.82 % y PC2 el 18.50 % de la varianza total.

3.3 Análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) y mapa de calor del volatiloma

El análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) y el mapa de calor del volatiloma evidenciaron diferencias en los perfiles químicos de *C. lechleri* según la etapa fenológica (**Figura 2**). El mapa de calor, basado en abundancias relativas autoscaladas y organizado mediante enlace completo con distancia euclidiana, mostró tres clústeres principales (a, b y c). El clúster a agrupó metabolitos con mayor abundancia en árboles jóvenes (Sapling), principalmente alcoholes alifáticos, cetonas volátiles y sesquiterpenos como 1-hexanol, 2-heptanol, 2-heptanona, bergamoteno y epicedrol. La predominancia de estos compuestos sugiere una mayor actividad de mecanismos de defensa inespecífica y una menor especialización del metabolismo secundario en estadios tempranos de desarrollo.

El clúster b estuvo conformado por metabolitos predominantes en árboles envejecidos, incluyendo compuestos oxigenados como eucaliptol, linalol, óxido de linalol, exo-fenchol y 2-dodecanona, además de bencenoides sustituidos. La acumulación de

metabolitos oxigenados podría estar asociada con una mayor complejidad metaboliómica y capacidad antioxidante en estadios avanzados del desarrollo. Por su parte, el clúster c agrupó metabolitos con patrones intermedios, destacándose sesquiterpenos de mayor complejidad estructural como α-cubebeno, β-cubebeno, γ-muuroleno, isogermacrena D y α-cadineno, además de 2-undecanona. Estos compuestos podrían reflejar ajustes dinámicos del metabolismo secundario relacionado con procesos de transición fisiológica y adaptación química durante el desarrollo vegetal.

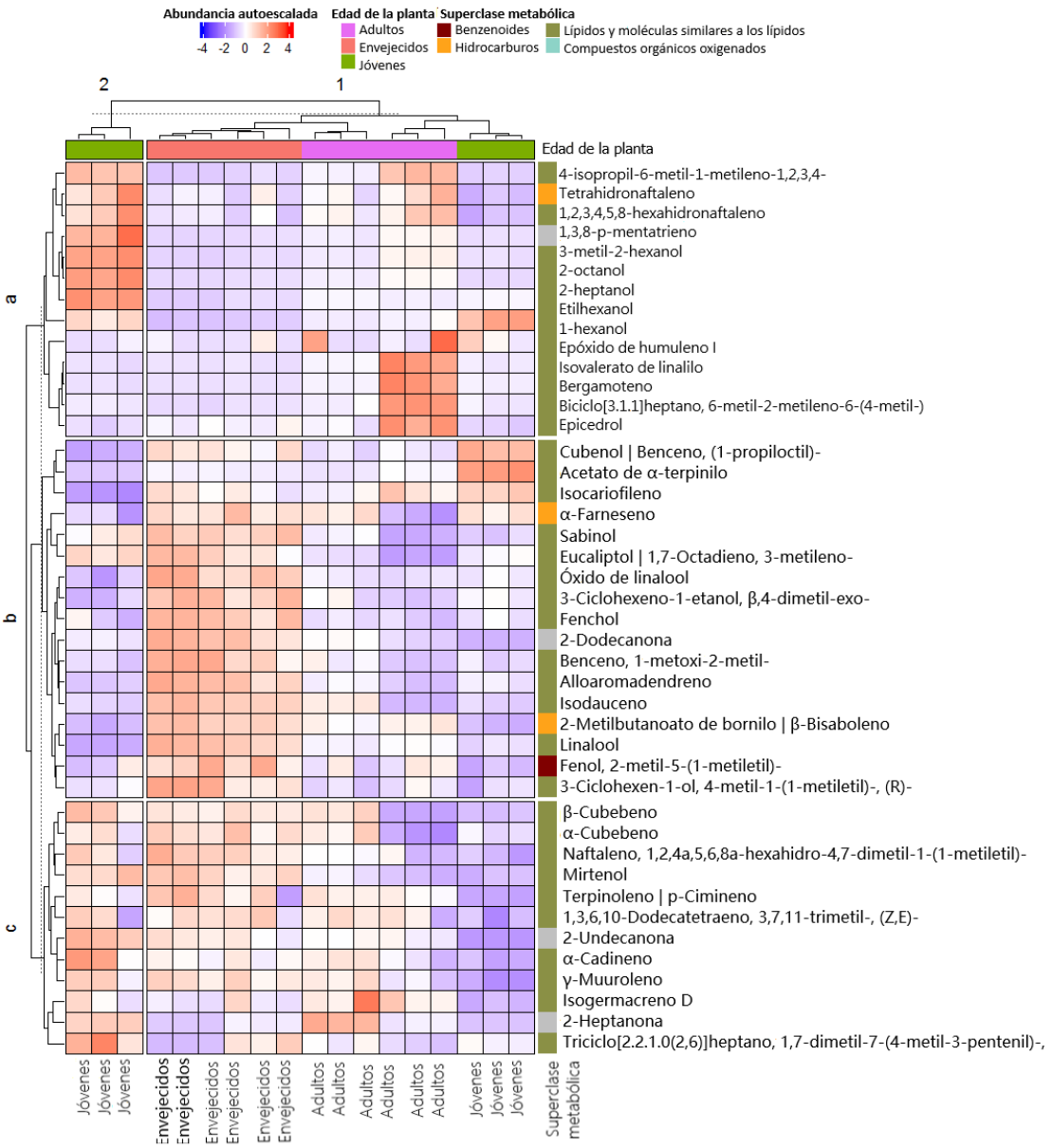


Figura 2. Mapa de calor de los metabolitos identificados en la resina de *C. lechleri* en función de la etapa de desarrollo, organizado mediante HCA. La escala de color refleja la abundancia relativa autoscalada (azul intenso = baja abundancia; rojo intenso = alta abundancia). Adultos, envejecidos, jóvenes. Las letras a, b y c indican los tres clústeres principales de metabolitos con patrones de abundancia diferenciados entre etapas.

3.4 Actividad antioxidante de los extractos acuosos de la resina de *C. lechleri*

La evaluación de la capacidad antioxidante total (TAC) de la resina de *C. lechleri* se realizó empleando dos métodos espectrofotométricos complementarios: ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)] y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Ambos

métodos cuantifican la capacidad de los extractos para neutralizar radicales libres estables, y los resultados se expresaron en mmol de equivalentes Trolox por gramo de extracto seco (mmol Trolox/g). Su uso conjunto permite una caracterización más integral de la actividad antioxidante: el DPPH detecta preferentemente antioxidantes hidrofóbicos mediante transferencia de átomos de hidrógeno, mientras que el ABTS•+ es más sensible a compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos por transferencia de electrones. A continuación se presentan los resultados para cada uno de ellos.

3.5 Método ABTS [Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)]

Para la cuantificación de la TAC por ABTS, se construyó una curva de calibración de Trolox, utilizando cinco niveles de concentración en el rango de 9.9 a 158.5 µM. La absorbancia del radical catiónico ABTS•+ fue medida a 411 nm con corrección de interferencias de fondo a 751 nm, según Escobar et al. (2018). La curva de calibración obtenida se muestra en la (**Figura 3**).

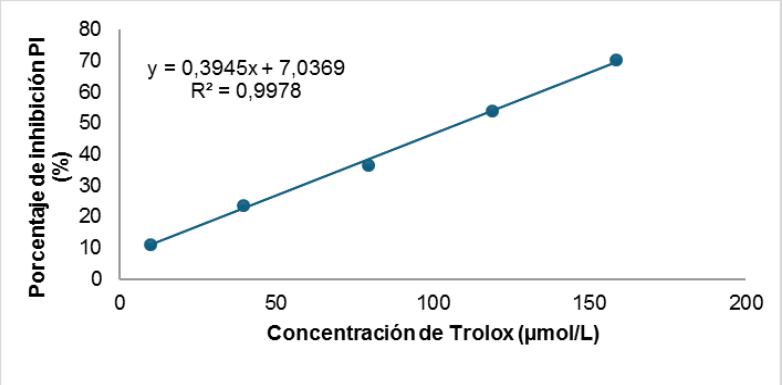


Figura 3. Curva de calibración del estándar trolox para el ensayo ABTS de la actividad antioxidante.

La curva de calibración ABTS presentó excelente linealidad (R^2 = 0.9978) con la ecuación PI(%) = 0.3945x + 7.037. La exactitud del método fue evaluada a tres niveles de concentración de control de calidad (QC): nivel bajo (59.45 µM): %R = 111.14 %; nivel medio (99.09 µM): %R = 95.60 %; nivel alto (138.72 µM): %R = 94.5 9%, todos dentro del criterio de aceptación del 80–120 % (Bobo-García et al., 2015). Estos resultados

confirman la idoneidad del método para la cuantificación de la TAC en los extractos de resina de *C. lechleri.*

La TAC por ABTS se determinó con tres réplicas analíticas por árbol (n = 6 réplicas por etapa de desarrollo). Los resultados completos se presentan en la **Tabla 2** y la distribución de los valores por etapa se ilustra en la **Figura 4.**

Tabla 2. Capacidad antioxidante total (TAC, mmol Trolox/g extracto seco) de la resina de *C. lechleri* determinada por el método ABTS, organizada por etapa de desarrollo y árbol.

Árbol / Planta	Réplica 1 (mmol/g)	Réplica 2 (mmol/g)	Réplica 3 (mmol/g)	Media (mmol/g)	DE
Etapa Joven (Sapling) — DAP: 79–86 cm					
Árbol joven planta 1	7.6997	8.0404	6.8727	7.5376	± 0.6005
Árbol joven planta 2	7.9029	6.8939	7.2445	7.3471	± 0.5123
MEDIA GLOBAL — Etapa Joven	—	—	—	7.4424 b	± 0.5100
Etapa Adulta (Young) — DAP: 92–96 cm					
Árbol adulto planta 1	8.6380	8.4533	8.8292	8.6402	± 0.1879
Árbol adulto planta 2	7.9029	7.8362	7.8695	7.8695	± 0.0334
MEDIA GLOBAL — Etapa Adulta	—	—	—	8.2548 a	± 0.4390
Etapa Envejecida (Mature) — DAP: 108–112 cm					
Árbol viejo planta 1	7.7397	8.9445	8.0348	8.2397	± 0.6280
Árbol viejo planta 2	8.1268	8.3221	7.9276	8.1255	± 0.1972
MEDIA GLOBAL — Etapa Envejecida	—	—	—	8.1826 a	± 0.4210

Nota. Los valores se presentan por réplica analítica y como media ± desviación estándar (DE) por árbol. La media global por etapa incluye la letra de agrupamiento de la prueba post hoc de Tukey HSD ($p < 0.05$). Letras distintas (a, b) sobre las medias globales indican diferencias estadísticamente significativas entre etapas de desarrollo.

El análisis de varianza (ANOVA tipo I) para el método ABTS se presenta en la **Tabla 3**. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en la TAC entre las tres etapas de desarrollo ($F = 4.87$, $p = 0.024$).

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA tipo I) de la capacidad antioxidante total medida por el método ABTS en la resina de *C. lechleri* según etapa de desarrollo.

Factor	GL	SC	CM	F	Valor de *p*
Etapa de desarrollo	2	1.5862	0.7931	4.87	0.024 *
Residual	3	0.4884	0.1628	—	—

Nota. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; *F*: estadístico *F* calculado; (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los árboles adultos presentaron la mayor TAC por ABTS (8.255 ± 0.439 mmol Trolox/g), seguidos por los envejecidos (8.183 ± 0.421 mmol Trolox/g), mientras que los jóvenes mostraron la menor actividad (7.442 ± 0.510 mmol Trolox/g). La prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) agrupó a adultos y envejecidos en el grupo *a* y a los jóvenes en el grupo *b* ($p < 0.05$), con una diferencia de 0.813 mmol/g entre adultos y jóvenes. La distribución de los valores de TAC por etapa se muestra en la F**igura 4**.

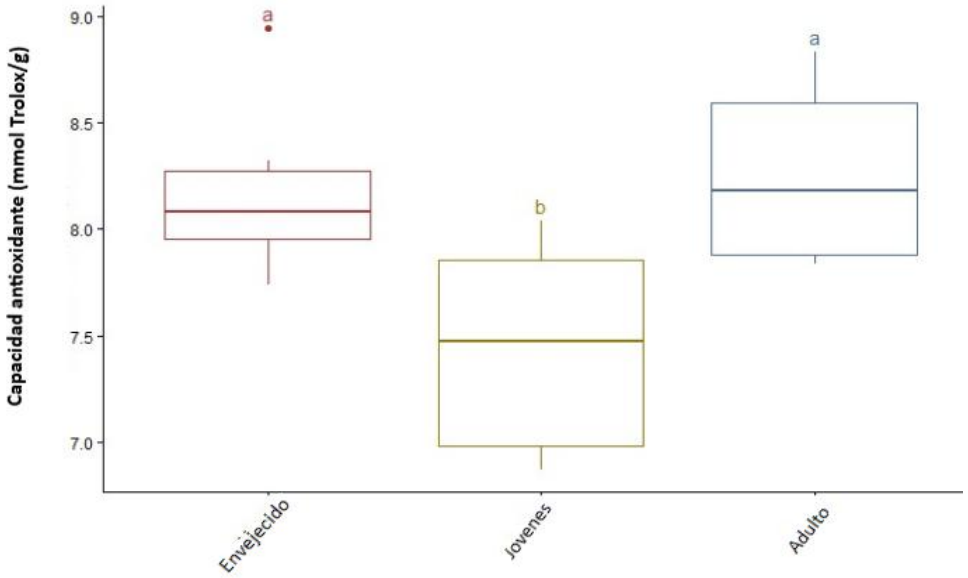


Figura 4. Actividad antioxidante de *C. lechleri* mediante el ensayo ABTS. Valores expresados como media ± desviación estándar.

3.6 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante total (TAC) mediante el método DPPH, se construyó una curva de calibración utilizando Trolox como estándar de referencia, empleando cinco niveles de concentración en el rango de 49.3 a 300.6 µM. La curva promedio utilizada para el cálculo de la TAC presentó la ecuación PI(%) = 0.2228x + 5.724 y un coeficiente de determinación de R^2 = 0.9984, evidenciando una adecuada relación lineal entre la concentración de Trolox y el porcentaje de inhibición del radical DPPH•. La curva de calibración obtenida se muestra en la **Figura 5.**

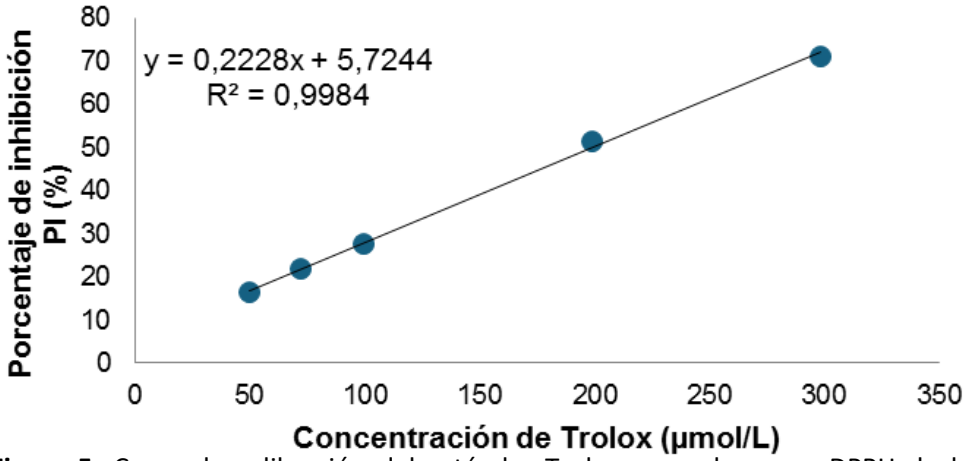


Figura 5. Curva de calibración del estándar Trolox para el ensayo DPPH de la actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante total (TAC) de los extractos de resina de *C. lechleri* fue determinada mediante el método DPPH utilizando tres réplicas analíticas (R1, R2 y R3) para cada árbol evaluado. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4** y la distribución de los valores de TAC por etapa de desarrollo se muestra en la **Figura 6**.

Tabla 4. Capacidad antioxidante total (TAC, mmol Trolox/g extracto) de la resina de *C. lechleri* determinada mediante el método DPPH. R1, R2 y R3 corresponden a las réplicas analíticas de cada árbol; DE: desviación estándar de las réplicas por árbol. La media global representa el promedio por etapa de desarrollo.

Árbol / Planta	Réplica 1 (mmol/g)	Réplica 2 (mmol/g)	Réplica 3 (mmol/g)	Media (mmol/g)	DE
Etapa Joven (Sapling) — DAP: 79–86 cm					
Árbol joven planta 1	3.9873	4.2184	3.8183	4.0080	± 0.2009
Árbol joven planta 2	3.7959	3.9535	3.4628	3.7374	± 0.2505
MEDIA GLOBAL — Etapa Joven	—	—	—	3.8727	± 0.2257
Etapa Adulta (Young) — DAP: 92–96 cm					
Árbol adulto planta 1	4.3544	4.1387	3.6437	4.0456	± 0.3644

Árbol adulto planta 2	4.2898	4.4260	4.3579	4.3579	± 0.0681
MEDIA GLOBAL — Etapa Adulta	—	—	—	4.2018	± 0.2162
Etapa Envejecida (Mature) — DAP: 108–112 cm					
Árbol viejo planta 1	4.6057	4.7718	4.4260	4.6012	± 0.1729
Árbol viejo planta 2	4.4603	4.5461	4.1848	4.3971	± 0.1888
MEDIA GLOBAL — Etapa Envejecida	—	—	—	4.4991	± 0.1809

El análisis de varianza (ANOVA tipo I) para el método DPPH se presenta en la **Tabla 5.**

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA tipo I) de la capacidad antioxidante total medida por el método DPPH en la resina de *C. lechleri* según etapa de desarrollo.

Factor	GL	SC	CM	*F*	Valor de *p*
Etapa de desarrollo	2	0.2871	0.1436	7.04	0.007 *
Residual	15	0.3061	0.0204	—	—

Nota. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico F calculado; (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

El ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas en la TAC entre las etapas de desarrollo ($F = 7.04$, $p = 0.007$). Los árboles envejecidos presentaron la mayor TAC (4.501 ± 0.281 mmol Trolox/g), seguidos por los adultos (4.336 ± 0.277 mmol Trolox/g), mientras que los jóvenes mostraron la menor actividad (3.976 ± 0.368 mmol Trolox/g). La prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) agrupó a adultos y envejecidos en el grupo a y a los jóvenes en el grupo b ($p < 0.05$). La diferencia entre envejecidos y jóvenes fue de 0.525 mmol/g ($p = 0.006$) y entre adultos y jóvenes de 0.360 mmol/g ($p = 0.039$). No se encontraron

diferencias significativas entre adultos y envejecidos (p = 0.482). La distribución de los valores de TAC por etapa se muestra en la **Figura 6**.

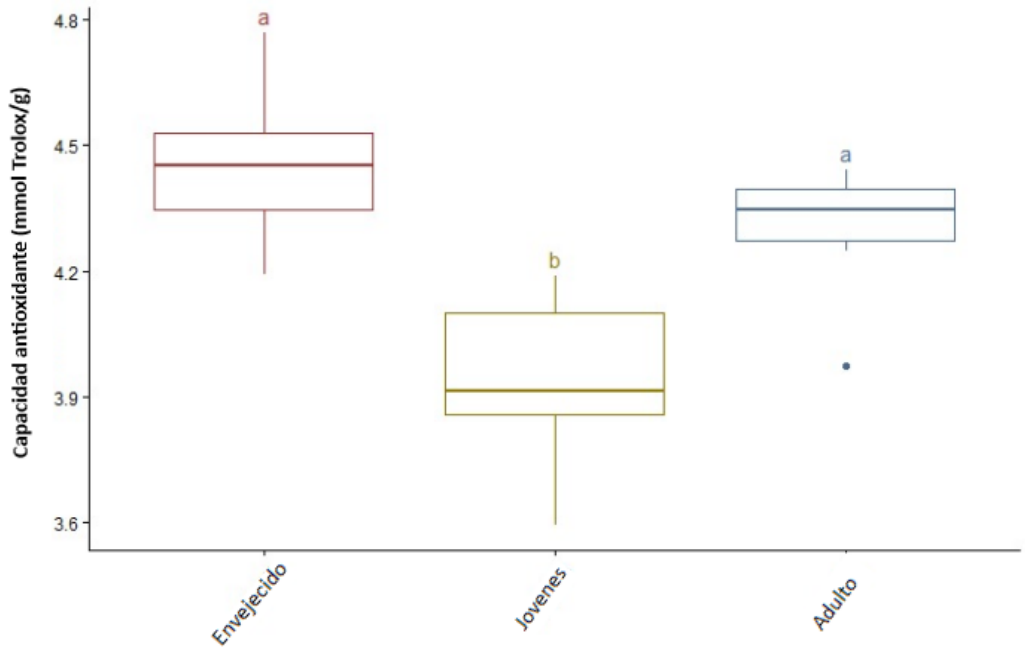


Figura 6. Capacidad antioxidante total de los extractos de resina de *C. lechleri* evaluada mediante el ensayo DPPH

3.7 Comparación integrada de los métodos ABTS y DPPH

Ambos métodos confirmaron consistentemente el mismo patrón de incremento en la TAC con la edad del árbol: las etapas adulta y envejecida presentaron mayor actividad antioxidante que la etapa joven, independientemente del método empleado. Los valores de TAC obtenidos por ABTS (7.442–8.255 mmol Trolox/g) fueron superiores a los determinados por DPPH (3.976–4.501 mmol Trolox/g), diferencia esperada debido a que el radical ABTS•+ detecta antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos, mientras que el DPPH• es más selectivo hacia antioxidantes lipofílicos.

3.8 Correlación - Caracterización química / actividad antioxidante

Con la finalidad de demostrar la relación entre la composición química del volatiloma y las actividades antioxidantes, se realizó un gráfico biplot basado en el análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 7**). Este gráfico permitió visualizar simultáneamente la distribución de los picos cromatográficos identificados y su contribución al agrupamiento de las muestras según la etapa de desarrollo de *C. lechleri*. Los compuestos localizados en el cuadrante positivo de PC1 se asociaron principalmente con las muestras de árboles jóvenes, mientras que los metabolitos ubicados en el cuadrante negativo de PC1 mostraron una mayor relación con las muestras correspondientes a árboles envejecidos y adultos .

Adicionalmente, el biplot permitió observar la localización de los compuestos relacionados con las actividades antioxidantes ABTS y DPPH, representados mediante puntos rosados, los cuales se distribuyeron próximos a metabolitos comoóxido de linalol, linalol, α-farneseno, sabinol, cubenol y los cubebenos (α- y β-cubebene), sugiriendo una posible asociación entre estos compuestos y la actividad antioxidante observada. Asimismo, metabolitos como epicedrol, bergamoteno e isocariofileno también mostraron proximidad relativa con las variables antioxidantes dentro del espacio factorial. Estos resultados se encuentran en concordancia con el patrón observado en el mapa de calor (**Figura 2**), donde compuestos como cubenol, cubebenos, linalool y α-farneseno mostraron mayores intensidades relativas principalmente en las muestras correspondientes a árboles envejecidos y adultos, mientras que alcoholes y cetonas de menor complejidad estructural presentaron una mayor abundancia en las muestras jovenes.

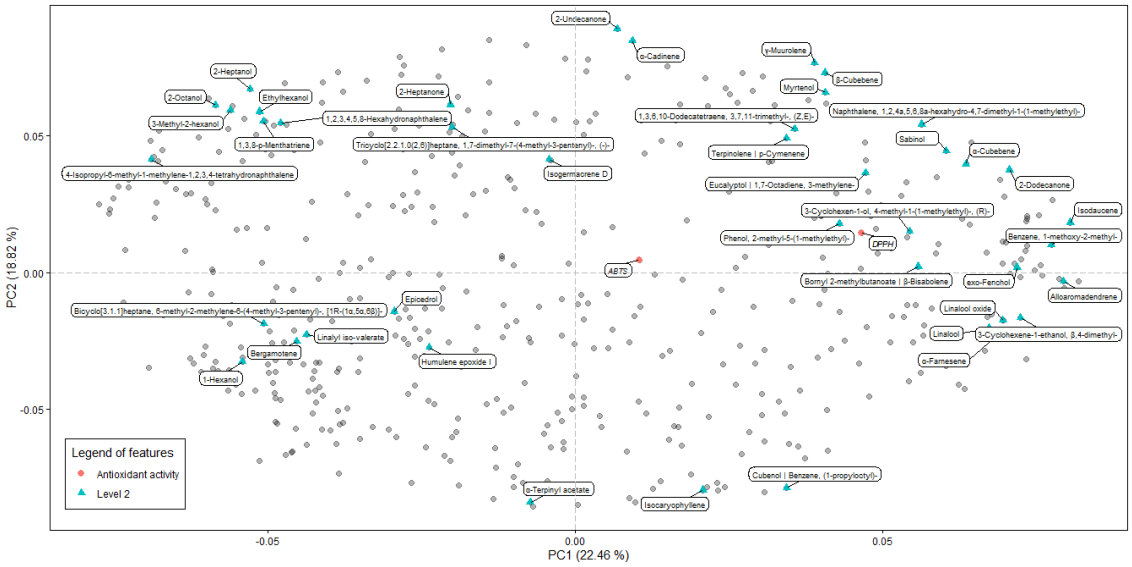


Figura 7. Biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) del volatiloma de la resina de *Croton lechleri* en diferentes etapas de desarrollo. Los puntos grises representan las características detectadas (features), los puntos rosados corresponden a metabolitos con actividad antioxidante identificada y los triángulos celestes indican metabolitos anotados con nivel de identificación 2.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

El presente estudio identificó 94 compuestos en la resina de *C. lechleri*, de los cuales 70 alcanzaron un nivel de certeza 2 según los criterios de Sumner et al. (2007). Este número es considerablemente superior al reportado por Bellesia et al. (1996), quienes identificaron originalmente 16 compuestos volátiles en el espacio de cabeza de la savia de *C. lechleri* mediante GC-MS, incluyendo acetato de etilo y propionato de etilo como componentes mayoritarios. La diferencia en el número de metabolitos identificados refleja tanto el avance en la sensibilidad instrumental como el uso de herramientas bioinformáticas especializadas como MS-DIAL, MZmine y eRah, que permiten una deconvolución más eficiente de los espectros de masas (Tsugawa et al., 2015; Heuckeroth et al., 2024).

Los compuestos predominantes identificados con mayor confianza espectral: eucaliptol, linalol, α-pineno y γ-terpineno, pertenecen a la clase de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados, coincidiendo con los reportes de Cevallos Verdesoto et al. (2016) y De Marino et al. (2008), quienes caracterizaron la fracción volátil de la resina de *Croton* spp. como rica en terpenos con actividades biológicas relevantes. En particular, el linalol y el eucaliptol son compuestos ampliamente documentados por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Gupta et al., 2008), lo que otorga coherencia química a los valores elevados de TAC observados en las etapas de mayor madurez (**Tabla 1, Figura 2**).

La presencia de alcoholes alifáticos de cadena corta como 1-hexanol, 2-heptanol y etilhexanol como componentes principales en las plántulas es consistente con el perfil volátil típico de tejidos vegetales en estadios tempranos de desarrollo, en los que predominan compuestos de la ruta de los oxilípidos derivados de la degradación de ácidos grasos insaturados, particularmente del ácido linoleico y linolénico (Rosenkranz & Schnitzler, 2016). Estos compuestos, también conocidos como *green leaf volatiles*, desempeñan funciones primarias en la defensa inespecífica y en la señalización ante daño mecánico, pero presentan un potencial antioxidante significativamente inferior al

de los terpenos oxigenados (Peñuelas & Llusià, 2004), patrón que se observa claramente en el conglomerado a del mapa de calor (**Figura 2**).

De la misma manera, se evidenció la diferencia en el perfil químico debido a las etapas fenológicas a través del PCA y el HCA del volatiloma (**Figuras 1** y **2**). La transición desde perfiles ricos en compuestos alifáticos simples (árboles jóvenes) hacia perfiles dominados por sesquiterpenos oxigenados complejos (árboles envejecidos) es coherente con el patrón de ontogénesis química descrito en otras especies de la familia Euphorbiaceae y en plantas medicinales de metabolismo secundario terpenoide activo.

Como se observa en la **Figura 1**, las muestras de árboles jóvenes presentan una mayor dispersión en el eje PC2, mientras que los envejecidos se concentran en la región negativa del PC1, lo que evidencia un cambio progresivo en la composición de los metabolitos secundarios. Este patrón ha sido documentado en especies como *Artemisia annua* L., en la que Towler y Weathers (2015) demostraron que las concentraciones de artemisinina y otros metabolitos secundarios clave varían significativamente a lo largo del ciclo de vida de la planta, con acumulaciones máximas en estadios maduros. De manera análoga, Yuan et al. (2023) reportaron cambios sustanciales en la acumulación de ginsenósidos en *Panax ginseng* en función de la edad del individuo.

En *C. lechleri*, la diferenciación química entre etapas puede explicarse, al menos parcialmente, por la actividad diferencial de las rutas biosintéticas de terpenos. En los árboles jóvenes, la predominancia de alcoholes alifáticos y cetonas volátiles de cadena corta sugiere una mayor contribución de la ruta de los oxilípidos y una actividad aún limitada de las rutas terpenoides (Rosenkranz & Schnitzler, 2016). En los árboles adultos, la aparición de monoterpenos y sesquiterpenos de complejidad intermedia como los cubebenos, el isocariofileno y el 2-undecanona (clúster c, **Figura 2**) podría reflejar la activación progresiva tanto de la ruta del mevalonato (MVA) como de la ruta independiente del mevalonato (MEP/DOXP), que son las principales vías biosintéticas de terpenos en plantas (Croteau et al., 2000; Tholl, 2006). En los árboles envejecidos, la acumulación de sesquiterpenos oxigenados de mayor complejidad estructural como el cubenol, el eucaliptol, el linalol y el óxido de linalol (clúster b, **Figura 2**) evidencia una mayor actividad consolidada de la ruta MVA, consistente con el incremento en la

demanda metabólica de defensa química y protección celular que se observa en estadios avanzados del desarrollo vegetal (Croteau et al., 2000).

Adicionalmente, se evidenció que estas diferencias a nivel químico se traducen en variaciones en la actividad biológica, particularmente en la actividad antioxidante. Los resultados de capacidad antioxidante total obtenidos mediante los métodos ABTS y DPPH (**Tablas 2–5**; **Figuras 4** y **6**) demostraron un incremento estadísticamente significativo de la TAC con el avance de la etapa de desarrollo de *C. lechleri* (ABTS: F = 4.87, p = 0.024; DPPH: F = 7.04, p = 0.007). Este patrón es consistente con la hipótesis general de que la acumulación progresiva de metabolitos secundarios bioactivos contribuye al aumento de la capacidad antioxidante en estadios maduros.

Los valores de TAC-ABTS registrados (7.44–8.26 mmol Trolox/g) son comparables con los reportados por Escobar et al. (2018), quienes obtuvieron valores en el rango de 5–10 mmol Trolox/g en sangre de drago bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Los valores de TAC-DPPH (3.98–4.50 mmol Trolox/g) resultaron inferiores a los reportados por Cevallos Verdesoto et al. (2016), quienes obtuvieron hasta 6.2 mmol Trolox/g en extractos metanólicos de *C. lechleri* de Ecuador, diferencia atribuible a las variaciones metodológicas en la concentración de extracto utilizada (0.02 mg/mL en el presente estudio).

La diferencia entre los valores de TAC por ABTS y DPPH es metodológicamente esperada: el radical ABTS•+ detecta antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos, mientras que el DPPH• es más selectivo hacia antioxidantes hidrofóbicos por transferencia de átomos de hidrógeno (Prior et al., 2005; Brand-Williams et al., 1995). Esta complementariedad justifica el uso conjunto de ambos métodos, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 6**.

La ausencia de diferencia significativa entre adultos y envejecidos en el método DPPH (p = 0.482), visible en la **Figura 6**, sugiere un aumento en la acumulación de antioxidantes hidrofóbicos a partir de la etapa adulta, lo que tendría implicaciones directas en la recolección.

Estos resultados tienen implicaciones directas para el manejo sostenible de *C. lechleri*. La demostración de diferencias significativas tanto en el perfil volátil (**Figura 2**) como en la actividad antioxidante (**Figuras 4** y **6**) entre etapas de desarrollo establece que la edad del árbol es una variable crítica para garantizar la calidad y uniformidad de los productos derivados de la sangre de drago.

Desde una perspectiva aplicativa, los árboles adultos (DAP: 92–96 cm) representan la etapa de recolección con mayor potencial, dado que presentan: (i) TAC significativamente superior a la de los jóvenes ($p < 0.05$) por ambos métodos; (ii) TAC estadísticamente equivalente a la de los envejecidos ($p > 0.05$); y (iii) mayor abundancia relativa de los marcadores volátiles antioxidantes identificados en la (**Tabla 7**). Adicionalmente, ofrecen ventajas logísticas y de sostenibilidad frente a los envejecidos, al poder ser sometidos a múltiples recolecciones sin comprometer su viabilidad a largo plazo.

Entre los compuestos volátiles que mostraron mayor abundancia relativa en árboles adultos y envejecidos se destacan el linalol, el óxido de linalol, el eucaliptol, los cubebenos (α-cubebeno y β-cubebeno), el cubenol, el α-farneseno, el bergamoteno, el epicedrol y el isocariofileno (**Tabla 7**). Estos compuestos han sido ampliamente reportados en la literatura por sus propiedades antioxidantes en otras especies vegetales (Gupta et al., 2008; De Marino et al., 2008), por lo que constituyen posibles candidatos a evaluar en estudios futuros orientados a determinar su contribución individual a la actividad antioxidante de la resina de *C. lechleri*. Cabe señalar que, dado que la TAC fue evaluada sobre extracto seco y no sobre la fracción volátil aislada, esta asociación corresponde a un patrón descriptivo y no implica una relación causal demostrada entre estos compuestos y los valores de TAC determinados por ABTS y DPPH; la recomendación de priorizar la etapa adulta para la recolección se sustenta en los resultados estadísticamente significativos de TAC presentados en la sección anterior, independientemente del perfil volátil.

Estos hallazgos son consistentes con la práctica tradicional de comunidades indígenas de la Amazonía ecuatoriana, que históricamente han preferido árboles de mediano y gran porte (Lock & Rojas, 2004). El presente estudio aporta la primera evidencia

cuantitativa del sustento metabolómico de esta práctica empírica, contribuyendo al desarrollo de protocolos estandarizados de recolección y control de calidad para la industria farmacéutica y cosmética.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones

El presente estudio determinó el perfil de compuestos volátiles y la capacidad antioxidante de la resina de *Croton lechleri* en tres etapas de desarrollo (joven, adulto y envejecido) mediante HS-GC-MS, así se lograron identificar 94 compuestos, de los cuales 70 alcanzaron un nivel de certeza 2 según los criterios de Sumner et al. (2007). El perfil volátil mostró una transición clara en función de la etapa de desarrollo: los árboles jóvenes presentaron una mayor proporción de alcoholes alifáticos y cetonas de cadena corta (1-hexanol, 2-heptanol, etilhexanol), mientras que los árboles adultos y envejecidos mostraron una mayor abundancia relativa de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados de mayor complejidad estructural, como el linalol, el óxido de linalol, el eucaliptol, los cubebenos, el cubenol, el α-farneseno, el bergamoteno, el epicedrol y el isocariofileno. El análisis multivariante (PCA y HCA) confirmó que estas tres etapas de desarrollo constituyen conglomerados químicamente diferenciables, evidenciando un cambio progresivo en la composición del volatiloma a lo largo de la ontogenia del árbol.

La capacidad antioxidante total (TAC), evaluada mediante los métodos ABTS y DPPH, presentó un incremento estadísticamente significativo con el avance de la etapa de desarrollo (ABTS: $F = 4.87$, $p = 0.024$; DPPH: $F = 7.04$, $p = 0.007$). Los árboles adultos y envejecidos mostraron valores de TAC significativamente superiores a los de los árboles jóvenes en ambos métodos, sin diferencias estadísticamente significativas entre adultos y envejecidos (DPPH: $p = 0.482$), lo que sugiere una estabilización de la capacidad antioxidante a partir de la etapa adulta.

Los compuestos volátiles que mostraron mayor abundancia relativa en las etapas de mayor madurez constituyen marcadores químicos diferenciales de utilidad para la

caracterización de la resina según la edad del árbol; sin embargo, dado que la TAC fue evaluada sobre extracto seco y no sobre la fracción volátil aislada, no fue posible establecer en este estudio una relación causal entre estos compuestos y los valores de capacidad antioxidante obtenidos, por lo que dicha asociación debe entenderse como un patrón descriptivo y no como evidencia confirmatoria.

En conjunto, los resultados evidencian que la etapa de desarrollo de *C. lechleri* es una variable determinante tanto del perfil químico volátil como de la capacidad antioxidante de su resina, cumpliéndose así el objetivo general y los objetivos específicos planteados en la presente investigación.

5.2 Recomendaciones

Con base en los hallazgos obtenidos, se recomienda:

Priorizar la recolección de resina de *C. lechleri* en árboles de etapa adulta (DAP: 92–96 cm), dado que presentan una capacidad antioxidante estadísticamente equivalente a la de los árboles envejecidos, sin comprometer la viabilidad del individuo a largo plazo ni requerir su tala, lo cual favorece un aprovechamiento sostenible del recurso.

Ampliar el tamaño de muestra en futuros estudios, incluyendo un mayor número de individuos por etapa de desarrollo y, de ser posible, en distintas localidades de la Amazonía ecuatoriana, con el fin de evaluar la influencia de factores edafoclimáticos sobre la variabilidad del volatiloma y la capacidad antioxidante.

Explorar la actividad biológica individual de los compuestos identificados como marcadores diferenciales mediante ensayos de purificación y evaluación in vitro, dada su relevancia reportada en la literatura para otras matrices vegetales (Gupta et al., 2008; De Marino et al., 2008).

Fomentar la articulación de los resultados de este estudio con las prácticas tradicionales de recolección de comunidades indígenas de la Amazonía ecuatoriana, contribuyendo

al desarrollo de protocolos estandarizados de recolección y control de calidad orientados a la industria farmacéutica y cosmética.

REFERENCIAS

Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th ed.). Allured Publishing Corporation.

Aksenov, A. A., Laponogov, I., Zhang, Z., Doran, S. L., Belluomo, I., Veselkov, D. y Veselkov, K. (2021). Auto-deconvolution and molecular networking of gas chromatography–mass spectrometry data. *Nature Biotechnology*, *39*(2), 169–173. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0700-3

Bellesia, F., Pinetti, A. y Tirillini, B. (1996). Headspace analysis of *Croton lechleri* L. sap. *Journal of Essential Oil Research*, *8*(4), 435–437. https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700659

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R. y Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(1), 204–209. https://doi.org/10.1002/jsfa.6787

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)91775-7

Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R. y Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, *14*(6), 72. https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3

Cai, Y., Chen, Z. P. y Phillipson, J. D. (1993). Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, *32*(3), 755–760. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95166-5

Cai, Y., Evans, F. J., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., Zenk, M. H. y Gleba, Y. Y. (1991). Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, *30*(6), 2033–2040. https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85063-6

Cevallos Verdesoto, D. O., Jaramillo Jaramillo, C., Cuesta Rubio, O., Zaldua, J., Gastón García y Rojas de Astudillo, L. (2016). Composición química, actividad cicatrizante y toxicidad del látex de *Croton lechleri*. *Revista Científica*, *XXVI*(2), 95–103. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95945988006

Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). En B. B. Buchanan, W. Gruissem y R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 1250–1318). American Society of Plant Physiologists.

De Marino, S., Gala, F., Zollo, F., Vitalini, S., Fico, G., Visioli, F. y Iorizzi, M. (2008). Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules*, *13*(6), 1219–1229. https://doi.org/10.3390/molecules13061219

Escobar, J. D., Prieto, C., Pardo-Figuerez, M. y Lagaron, J. M. (2018). Dragon's blood sap: Storage stability and antioxidant activity. *Molecules*, *23*(10), 2641. https://doi.org/10.3390/molecules23102641

Field, A. (2013). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (4th ed.). Sage Publications.

Gupta, D., Bleakley, B. y Gupta, R. K. (2008). Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*, *115*(3), 361–380. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018

Heuckeroth, S., Damiani, T., Smirnov, A., et al. (2024). Reproducible mass spectrometry data processing and compound annotation in MZmine 3. *Nature Protocols*, *19*, 2597–2641. https://doi.org/10.1038/s41596-024-00996-y

Jones, K. (2003). Review of sangre de drago (*Croton lechleri*) — A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *9*(6), 877–896. https://doi.org/10.1089/107555303771952235

Lock, O. y Rojas, R. (2004). Química y farmacología del *Croton lechleri* Muell.Arg., ("Sangre de grado"). *Revista de Química*, *18*(1), 11–18. https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/18661

Milanowski, D. J., Winter, R. E. K., Elvin-Lewis, M. P. F. y Lewis, W. H. (2002). Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *Journal of Natural Products*, *65*(6), 814–819. https://doi.org/10.1021/np000270v

Molole, G. J., Gure, A. y Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC Chemistry*, *16*(1), 48. https://doi.org/10.1186/s13065-022-00841-x

National Institute of Standards and Technology. (1998). *NIST Mass Spectral Database, NIST 98.* National Institute of Standards and Technology.

Nogueira, R. F., Righetti, S. L. y Toledo, M. C. (2016). Liofilización de extractos vegetales: Conservación de compuestos bioactivos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, *18*(3), 491–498. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_001

Peñuelas, J. y Llusià, J. (2004). Plant VOC emissions: Making use of the unavoidable. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(8), 402–404. https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.06.002

Prior, R. L., Wu, X. y 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

Rosenkranz, M. y Schnitzler, J.-P. (2016). Plant volatiles. En *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–9). Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000910.pub3

Silva, A. C., Lopes, P. M., Barros de Azevedo, M. M., Costa Machado, D., Alviano, C. S. y Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. *Molecules*, *17*(6), 6305–6316. https://doi.org/10.3390/molecules17066305

Smirnov, A., Qiu, Y., Jia, W., Walker, D. I., Jones, D. P. y Du, X. (2019). ADAP-GC 4.0: Application of clustering-assisted multivariate curve resolution to spectral deconvolution of gas chromatography–mass spectrometry metabolomics data. *Analytical Chemistry*, *91*(14), 9069–9077. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01424

Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W. y Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, *3*(3), 211–221. https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2

Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(3), 297–304. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014

Towler, M. J. y Weathers, P. J. (2015). Variations in key artemisinic and other metabolites throughout plant development in *Artemisia annua* L. for potential therapeutic use. *Industrial Crops and Products*, *67*, 185–191. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.007

Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., et al. (2015). MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, *12*, 523–526. https://doi.org/10.1038/nmeth.3393

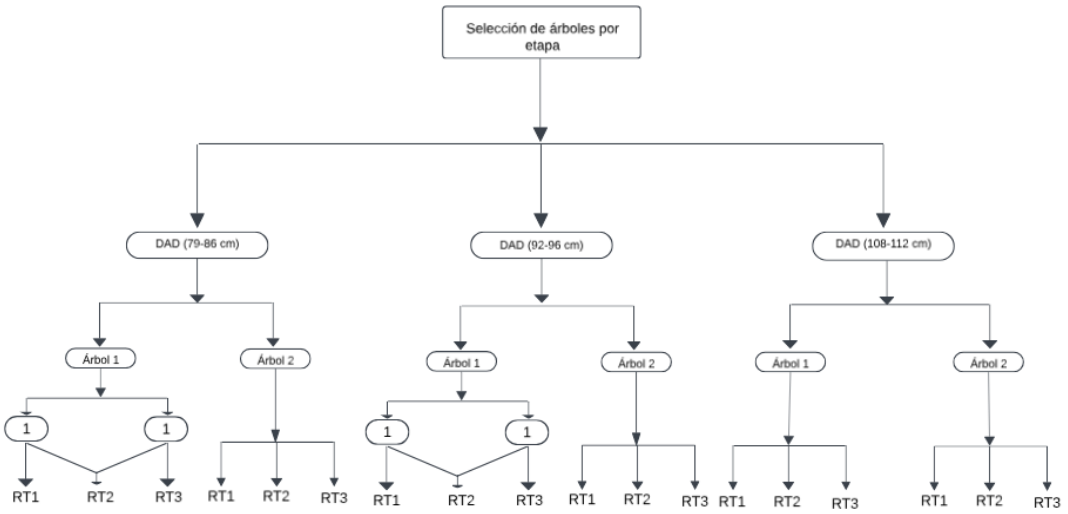
Yuan, W., Wang, Q., Pei, W., Li, S., Wang, T., Song, H., Teng, D., Kang, T. y Zhang, H. (2023). Age-induced changes in ginsenoside accumulation and primary metabolic characteristics of *Panax ginseng* in transplantation mode. *Journal of Ginseng Research*, *48*(1), 103–111. https://doi.org/10.1016/j.jgr.2023.09.003

ANEXOS

Anexo 1. Registro de Muestras de Árboles Sangre de Drago con Datos de Ubicación, msnm, metros sobre el nivel del mar, coordenadas GPS en el sistema UTM 18, donde, X, longitud, e Y, latitud.

Fecha de recolección	Nombre de muestra	Muestra	Cantidad mL	Ubicación geográfica		
				X	Y	msnm
27/6/2024	Árbol sangre de drago joven	1	50	186346	9916898	1174
27/6/2024	Árbol sangre de drago joven	1	50	186346	9916898	1174
27/6/2024	Árbol sangre de drago joven	2	50	186323	9916915	1166
27/6/2024	Árbol sangre de drago adulto	1	40	186320	9916896	1181
27/6/2024	Árbol sangre de drago adulto	1	40	186320	9916896	1181
27/6/2024	Árbol sangre de drago adulto	2	40	186350	9916898	1181
27/6/2024	Árbol sangre de drago viejo	1	50	186334	9917025	1179
27/6/2024	Árbol sangre de drago viejo	2	50	186334	9916835	1176

Anexo 2. Diagrama de selección de árboles y recolección de muestras según etapa de desarrollo



Anexo 3. Diámetros del tronco del árbol en cada etapa de desarrollo.

Muestra	Diámetro (cm)
Joven	79-86
Adulto	92-96
Viejo	108-112

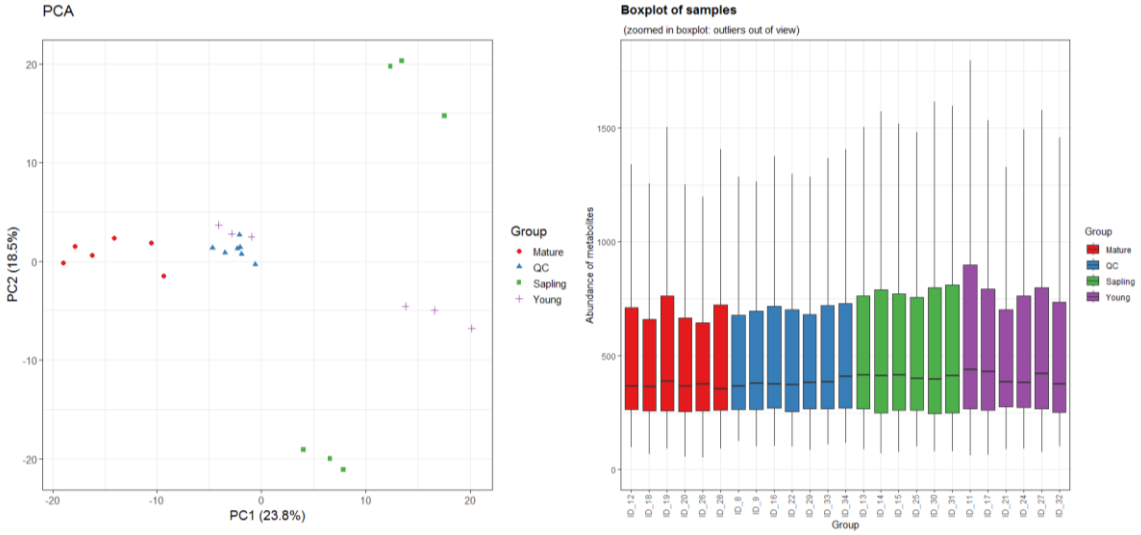
Anexo 4. Registro de masa promedio de savia concentrada de *Croton lechleri*.

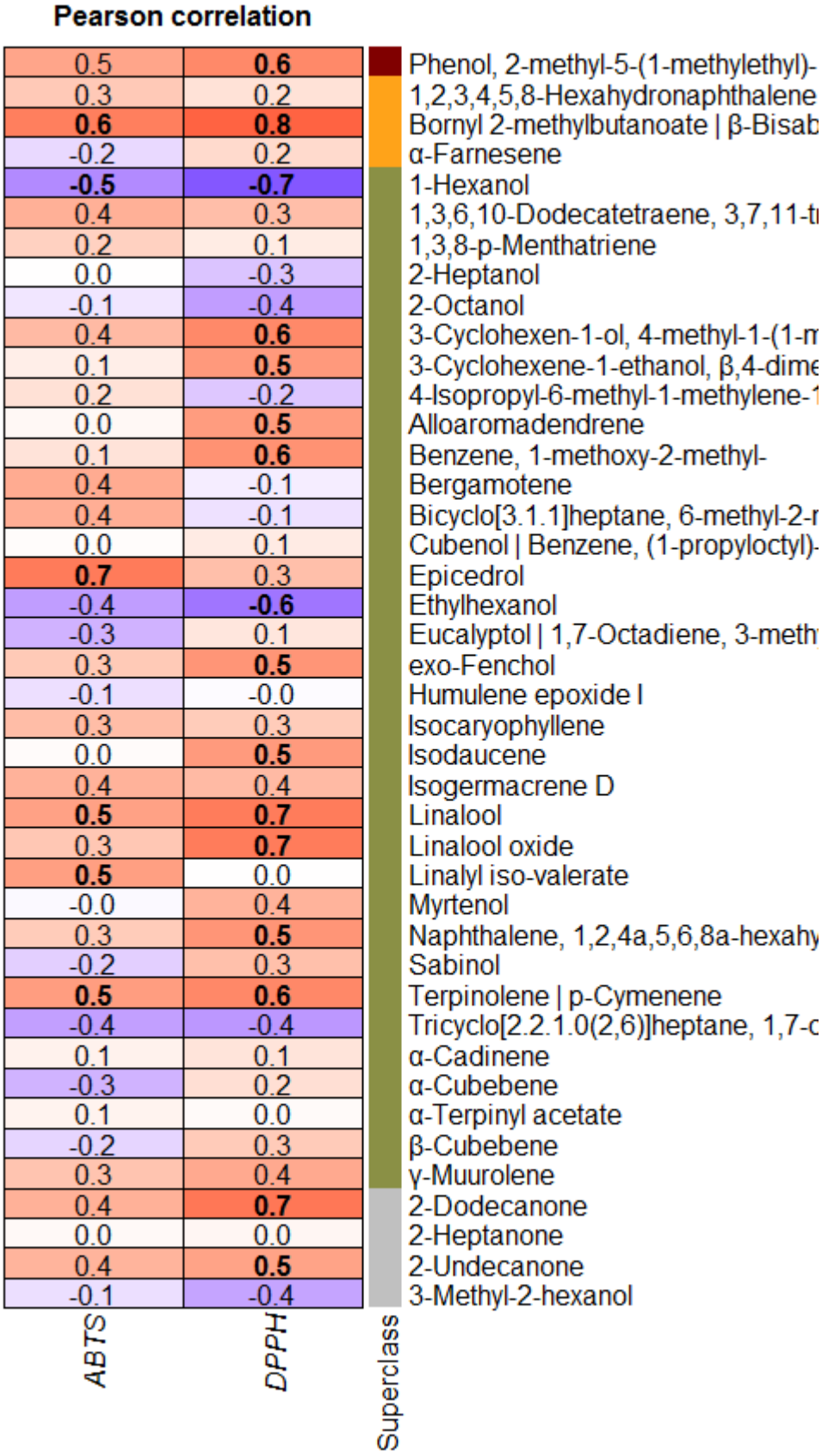
Muestra	Promedio (mg)	Promedio (g)	Desv. estándar (mg)
Árbol viejo 1 – R1	554.2	0.5542	0.1
Árbol viejo 1 – R2	551.7	0.5517	0.2
Árbol viejo 1 – R3	546.2	0.5462	0.1
Árbol viejo 2 – R1	552.5	0.5525	0.1
Árbol viejo 2 – R2	555.9	0.5559	0.1
Árbol viejo 2 – R3	550.2	0.5502	0.3
Árbol joven 1 – R1	548.7	0.5487	0.1
Árbol joven 1 – R2	546.1	0.5461	0.2
Árbol joven 1 – R3	543.5	0.5435	0.1
Árbol joven 2 – R1	535.4	0.5354	0.2
Árbol joven 2 – R2	544.2	0.5442	0.2
Árbol joven 2 – R3	536.9	0.5369	0.2
Árbol adulto 1 – R1	534.8	0.5348	0.1
Árbol adulto 1 – R2	532.3	0.5323	0.1
Árbol adulto 1 – R3	532.7	0.5327	0.2
Árbol adulto 2 – R1	543.4	0.5434	0.2
Árbol adulto 2 – R2	549.7	0.5497	0.2
Árbol adulto 2 – R3	549.8	0.5498	0.2

Anexo 5. Masa de los extractos secos de *C. lechleri*.

Muestra	Promedio (mg)	Promedio (g)	Desv. estándar (mg)
Árbol viejo 1 – R1	114.7	0.1147	0.1
Árbol viejo 1 – R2	117.0	0.1170	0.2
Árbol viejo 1 – R3	118.0	0.1180	0.3
Árbol viejo 2 – R1	111.1	0.1111	0.1
Árbol viejo 2 – R2	121.7	0.1217	0.2
Árbol viejo 2 – R3	114.6	0.1146	0.1
Árbol joven 1 – R1	92.1	0.0921	0.2
Árbol joven 1 – R2	95.3	0.0953	0.1
Árbol joven 1 – R3	93.6	0.0936	0.1
Árbol joven 2 – R1	69.2	0.0692	0.2
Árbol joven 2 – R2	68.6	0.0686	0.1
Árbol joven 2 – R3	69.0	0.0690	0.2
Árbol adulto 1 – R1	66.4	0.0664	0.2
Árbol adulto 1 – R2	58.7	0.0587	0.1
Árbol adulto 1 – R3	63.2	0.0632	0.1
Árbol adulto 2 – R1	119.4	0.1194	0.2
Árbol adulto 2 – R2	115.6	0.1156	0.1
Árbol adulto 2 – R3	114.0	0.1140	0.1

Anexo 6. Análisis exploratorio del conjunto de datos mediante PCA y boxplot de las muestras.




Pearson correlation
0.5 0.6
0.3 0.2
0.6 0.8
-0.2 0.2
-0.5 -0.7
0.4 0.3
0.2 0.1
0.0 -0.3
-0.1 -0.4
0.4 0.6
0.1 0.5
0.2 -0.2
0.0 0.5
0.1 0.6
0.4 -0.1
0.4 -0.1
0.0 0.1
0.7 0.3
-0.4 -0.6
-0.3 0.1
0.3 0.5
-0.1 -0.0
0.3 0.3
0.0 0.5
0.4 0.4
0.5 0.7
0.3 0.7
0.5 0.0
-0.0 0.4
0.3 0.5
-0.2 0.3
0.5 0.6
-0.4 -0.4
0.1 0.1
-0.3 0.2
0.1 0.0
-0.2 0.3
0.3 0.4
0.4 0.7
0.0 0.0
0.4 0.5
-0.1 -0.4
ABTS
DPPH
Superclass
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
1,2,3,4,5,8-Hexahydronaphthalene
Bornyl 2-methylbutanoate | β-Bisab
α-Farnesene
1-Hexanol
1,3,6,10-Dodecatetraene, 3,7,11-t
1,3,8-p-Menthatriene
2-Heptanol
2-Octanol
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-m
3-Cyclohexene-1-ethanol, β,4-dime
4-Isopropyl-6-methyl-1-methylene-1
Alloaromadendrene
Benzene, 1-methoxy-2-methyl-
Bergamotene
Bicyclo[3.1.1]heptane, 6-methyl-2-m
Cubenol | Benzene, (1-propyloctyl)-
Epicedrol
Ethylhexanol
Eucalyptol | 1,7-Octadiene, 3-meth
exo-Fenchol
Humulene epoxide I
Isocaryophyllene
Isodaucene
Isogermacrene D
Linalool
Linalool oxide
Linalyl iso-valerate
Myrtenol
Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahy
Sabinol
Terpinolene | p-Cymenene
Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7-d
α-Cadinene
α-Cubebene
α-Terpinyl acetate
β-Cubebene
γ-Muurolene
2-Dodecanone
2-Heptanone
2-Undecanone
3-Methyl-2-hexanol