

## Optimización de la extracción de cafeína en hojas de *Ilex guayusa* Loes

Sting B. Luna-Fox<sup>\*1</sup>, Elder J. Calle-Cunyarache<sup>2</sup>, Gisela M. Calle-Cunyarache<sup>3</sup>,  
Yovin Cruz-Santos<sup>2</sup>, José G. Guamán-Castillo<sup>4</sup>, Johana R. Satan-Chuim<sup>5</sup>

- <sup>1)</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- <sup>2)</sup> Subgerencia de Desarrollo Agropecuario y Comercialización, Municipalidad Distrital de Huarango, Perú.
- <sup>3)</sup> Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú.
- <sup>4)</sup> Área de manejo de equipos, China Railwal 19 Bureau Group Corporation, Ecuador.
- <sup>5)</sup> Área de ciencias naturales, Unidad Educativa Intercultural Bilingüe Kumay, Ecuador.

(\* [sting@fi.mdp.edu.ar](mailto:sting@fi.mdp.edu.ar))

Recibido: 21/05/2025

Revisado: 29/07/2025

Aceptado: 19/08/2025

### Resumen

El objetivo de este estudio fue optimizar la extracción asistida por ultrasonido de cafeína en hojas secas de *Ilex guayusa* Loes mediante la metodología de superficie de respuesta. Se evaluó el efecto de la amplitud ultrasónica, tiempo y temperatura sobre la extracción de cafeína mediante un diseño factorial  $2^3$ . Para la optimización se empleó un diseño óptimo-combinado. Las condiciones que maximizaron la extracción de cafeína (1,589%) fueron: amplitud ultrasónica 55,99%, tiempo 29,17 min y temperatura 58,88°C. Debido a los presentes hallazgos, los extractos acuosos de *I. guayusa* se pueden proponer como un componente promisorio para bebidas energizantes naturales.

**Palabras clave:** alcaloide; modelos matemáticos; óptimo-combinado; optimización

### Abstract

**Optimization of caffeine extraction from *Ilex guayusa* Loes leaves.** The objective of this study was to optimize the ultrasound-assisted extraction of caffeine from dried leaves of *Ilex guayusa* Loes using the response surface methodology. The effect of ultrasonic amplitude, time and temperature on caffeine extraction was evaluated using a  $2^3$ -factorial design. An optimal-combined design was used for the optimization. The conditions that maximized caffeine extraction (1.589%) were: ultrasonic amplitude 55.99%, time 29.17 min and temperature 58.88°C. Due to the present findings, aqueous extracts of *I. guayusa* can be proposed as a promising component for natural energy drinks.

**Keywords:** Alkaloid; Mathematical models; Optimal-combined; Optimization

### Introducción

*Ilex guayusa* Loes., es una especie nativa de la región amazónica y pertenece a la familia *Aquifoliaceae*. Su distribución abarca varios países de Sudamérica, incluyendo Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia, donde crece en ecosistemas forestales húmedos. Esta planta se adapta a altitudes de hasta 2000 msnm y puede alcanzar una altura que va desde los 6 a 10 m<sup>1</sup>.

Diferentes investigaciones han informado sobre el uso habitual de *I. guayusa* como una bebida brindada en ceremonias al noroeste de la región amazónica<sup>2-4</sup>. Se ha indicado, que la infusión de sus hojas actúa como un remedio etnomédico frente a enfermedades venéreas, diabetes, dolor corporal y gripe<sup>5</sup>. El conocimiento local resalta el consumo de té de *I. guayusa* para incrementar la libido y la fertilidad; también, distintas culturas indígenas suelen beber el té de esta planta en ceremonias matutinas con el propósito de promover la purificación del cuerpo<sup>6</sup>.

Las hojas de *I. guayusa* poseen propiedades estimulantes que pueden disminuir la fatiga, esta acción es debido a que contiene cafeína y teobromina<sup>7</sup>. La cafeína, es un compuesto químico de origen natural presente en muchas plantas, semillas y frutas, incluidos el café, el té, el mate, las nueces, el cacao y la guaraná; se utiliza en el sector farmacéutico, alimentario y cosmético como estimulante circulatorio, respiratorio y del sistema nervioso central, además de vasodilatador y diurético<sup>8</sup>.

La cafeína se extrae de manera tradicional a escala de laboratorio utilizando disolventes puros (agua, benceno, cloroformo, tricloroetileno, diclorometano, acetona, metanol, etanol y acetoneitrilo), algunos de los cuales son perjudiciales para la salud<sup>9</sup>. En la actualidad, existen métodos de extracción más avanzados, como la espectrometría de movilidad iónica, la separación dispersa líquido-líquido, la cromatografía en columna con gradiente de elución, la extracción por microondas, la extracción

con fluido supercrítico con CO<sub>2</sub> y la extracción con ultrasonidos (EAU)<sup>10</sup>. Esta última técnica posee un perfil ventajoso frente a los disolventes orgánicos tradicionales, caracterizándose por su nula toxicidad y alta especificidad en la eliminación de cafeína sin afectar otros compuestos bioactivos<sup>11</sup>.

En general, la EAU mejora la eficacia de la extracción al producir derivados vegetales más ricos en compuestos químicos en comparación con otras técnicas<sup>12</sup>. A través de la cavitación acústica, la EAU aumenta el flujo de masa y la desintegración de la estructura celular, mejorando la eficiencia de extracción.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una técnica estadística y matemática que se utiliza ampliamente para mejorar y optimizar procesos que incluyen una o más variables dependientes que están vinculadas a una serie de variables independientes conocidas como factores<sup>13</sup>. Este enfoque permite al investigador obtener un modelo matemático idóneo para caracterizar el funcionamiento del proceso. La base del enfoque MSR es adaptar modelos matemáticos (lineales, cuadráticos, cúbicos, entre otros.) a los hallazgos experimentales proporcionados por el diseño experimental<sup>14</sup>. La verificación del modelo predictivo se realiza mediante un análisis de varianza.

La optimización del rendimiento de cafeína en hojas de *I. guayusa* a través de ultrasonidos contribuye, por un lado, a un mejor entendimiento de la influencia de los parámetros de extracción del proceso; por otro lado, expone el potencial que posee esta planta como fuente de alcaloides para usos industriales. La literatura actual, carece de información sobre las condiciones idóneas para maximizar la extracción de cafeína en hojas de *I. guayusa*. Con estos antecedentes, en este estudio se propuso optimizar la extracción asistida por ultrasonido de cafeína de *I. guayusa* Loes mediante la metodología de superficie de respuesta.

## Parte experimental

### Preparación de la muestra y obtención de los extractos acuosos

Las hojas de *I. guayusa* fueron compradas secas en el mercado local de la ciudad de Puyo, Ecuador. Las hojas se trituraron en un molino (marca KitchenAid, modelo BCG1110B) y se tamizaron hasta obtener partículas menores a 0,5 mm. Los extractos se obtuvieron mediante extracción con ultrasonidos<sup>15</sup>, para ello se utilizó un baño termostático (marca Wisd.23, modelo WUC-DO6H), con potencia de 110 W y 6 L de capacidad en el tanque. Se utilizó una relación sólida/líquido de 1:20 (m/v) y las extracciones se realizaron de acuerdo con las condiciones determinadas para cada experimento. Finalmente, cada extracto se filtró con papel Whatman No. 4 y los análisis siguientes se realizaron de inmediato.

### Determinación de cafeína

Se alcalinizó 10 mL del extracto acuoso con 1 mL de NaOH (0,1 M), y la cafeína se extrajo con dos porciones de 15 mL de

cloroformo. Luego, los extractos orgánicos combinados se concentraron en baño María hasta obtener un residuo seco. Después, la cafeína se disolvió en 50 mL de agua caliente (60–90°C) y se dejó enfriar, para completar el volumen final a 100 mL. De la mezcla anterior, se tomaron 5 mL a los cuales se le añadió 1 mL de HCL (0,01 M) y se completó el volumen a 25 mL con agua bidestilada. Las muestras se leyeron a 275 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible y la concentración de cafeína se determinó utilizando una curva de calibración (Ec.1;  $r^2 = 0,9991$ )<sup>16</sup>, construida con estándares de cafeína en un intervalo de 1 a 25 mg/mL. Los resultados se expresaron en porcentaje con relación a la materia seca.

$$A=0,006C+0,0011 \quad (1)$$

donde C = concentración de cafeína en la muestra (mg/mL) y A = absorbancia de la muestra.

### Análisis estadístico

Se ejecutó en dos etapas. En la primera etapa se bosquejó un diseño factorial 2<sup>3</sup> (tabla 1) con 19 experimentos y cada experimento se realizó por duplicado. Se evaluó la amplitud ultrasónica, tiempo y temperatura sobre el rendimiento de extracción de cafeína. El análisis de los factores significativos y no significativos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Como complemento, se utilizaron dos herramientas gráficas para reforzar la elección de variables significativas: un diagrama semi-normal de probabilidades y el diagrama de Pareto el cual incluye el criterio de corrección de Bonferroni como umbral de significancia ( $p < 0,05$ )<sup>17</sup>.

En la segunda etapa se analizaron los factores significativos para seleccionar las condiciones óptimas de extracción; con este fin, se aplicó un diseño óptimo-combinado (metodología de superficie de respuesta) empleando el software Design Expert (versión de prueba, Stat-Ease Inc., Minneanopolis, EE. UU). Los resultados experimentales se ajustaron al siguiente modelo matemático:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_{ii}x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \beta_{ii}x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij}x_ix_j \quad (2)$$

**Tabla 1.** Niveles estudiados de las variables independientes

*Factor	Nivel de variable codificada			
	Símbolo	Bajo	Central	Alto
		-1	0	1
Amplitud ultrasónica (%)	A	20	40	60
Tiempo (min)	B	10	20	30
Temperatura (°C)	C	30	45	60

### Validación del modelo de la MSR

Para validar el modelo, se determinaron y analizaron los valores de los coeficientes del R<sup>2</sup>-Predicho y R<sup>2</sup>-Ajustado. Se ejecutó la validez de cada experimento y el modelo predictivo se validó mediante el análisis ANOVA. El análisis mediante MSR

generó un modelo predictivo cuantitativo, cuya ecuación matemática fue usada para determinar los niveles óptimos de cada variable de estudio para maximizar el contenido de cafeína.

## Resultados y discusión

La figura 1A muestra los efectos normalizados de las variables de estudio sobre el contenido de cafeína. En estudios previos se ha indicado que los factores más significativos son los que tienen efectos normalizados más altos, y los efectos no significativos exhiben una distribución normal con variación constante y una media igual a cero<sup>17,18</sup>. Esto quiere decir que, si los efectos se representan en papel probabilístico normal, aquellos efectos positivos aparecerán distantes de la línea de normalidad; no obstante, los efectos no significativos constituirán una línea recta.

Por otro lado, el límite de Bonferroni junto al diagrama de Pareto identificó que los tres factores de estudio: amplitud ultrasónica (AU), tiempo (t) y temperatura (T) fueron significativos ( $p < 0,05$ ) en la extracción de cafeína, siendo el tiempo el factor más influyente.

El ANOVA (tabla 2) mostró que las interacciones entre factores no presentaron significancia estadística ( $p > 0,05$ ), indican-

do que estos actúan de forma independiente en el intervalo estudiado. La prueba de falta de ajuste también resultó no significativa ( $F = 2,17$ ;  $p > 0,05$ ), confirmando que el modelo describe adecuadamente los datos experimentales sin patrones residuales sistemáticos. Además, la curvatura del modelo factorial fue significativa, revelando comportamientos no lineales en las respuestas y la existencia de regiones óptimas dentro del espacio experimental evaluado.

El modelo factorial mostró un buen ajuste predictivo, con un  $R^2$  de 0,9997 que explica el 99,97% de la variabilidad de los datos, un  $R^2$ -ajustado de 0,9996 que considera la complejidad del modelo, y un  $R^2$ -predicho de 0,9993 que demuestra su capacidad predictiva. La diferencia menor a 0,2 entre el  $R^2$  ajustado y predicho cumple con el criterio de adecuación del modelo según lo reportado en la literatura, confirmando su robustez tanto para el análisis explicativo como predictivo dentro del intervalo experimental evaluado<sup>15-19</sup>.

En concordancia con los resultados obtenidos del diseño factorial, los tres factores de estudio se mostraron significativos en la extracción de cafeína; por lo tanto, fueron considerados para la optimización de cafeína en las hojas secas de *I. guayusa* mediante la MSR.

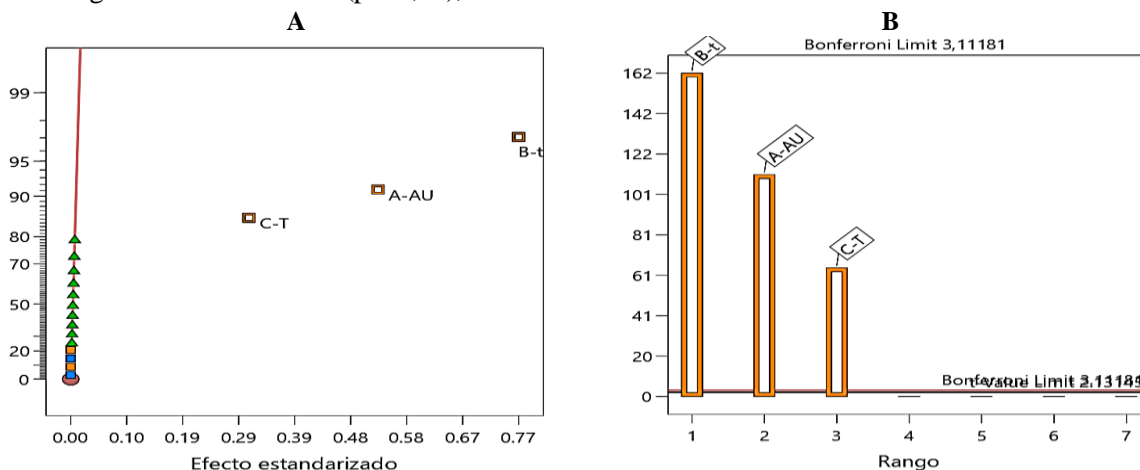


Fig. 1: Diagrama de efectos normalizados (1A), diagrama de Pareto (1B).

Tabla 2. ANOVA para el modelo factorial seleccionado.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F-valor	p-valor	
Modelo	3,87	7	0,5527	4696,04	< 0,0001	significativo
A-Amplitud	1,12	1	1,12	9495,56	< 0,0001	
B-Tiempo	2,38	1	2,38	20182,19	< 0,0001	
C-Temperatura	0,3760	1	0,3760	3194,55	< 0,0001	
AB	1,000E-12	1	1,000E-12	8,497E-09	0,9999	
AC	1,000E-12	1	1,000E-12	8,497E-09	0,9999	
BC	1,000E-12	1	1,000E-12	8,497E-09	0,9999	
ABC	1,000E-12	1	1,000E-12	8,497E-09	0,9999	
Curvatura	0,55	1	0,55	15,20	0,0016	significativo
Residual	0,0013	11	0,0001			
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	2,17	0,6478	no significativo
Error puro	0,0013	10	0,0001			
$R^2$	0,9997					
$R^2$ -Ajustado	0,9996					
$R^2$ -Predicho	0,9993					
Precisión adecuada	329,0988					

Diferentes investigadores han documentado el efecto significativo del factor tiempo sobre la extracción de diferentes compuestos bioactivos. Por ejemplo, se encontró que tiempos más prolongados dio mayores resultados de polifenoles totales en hojas de *Annona muricata* L<sup>20</sup>. Asimismo, se ha reportado que la concentración de cafeína en extractos acuosos de hojas secas de *I. guayusa* aumentó de manera proporcional con el tiempo de extracción<sup>21</sup>. Los resultados de este estudio demuestran que el tiempo es un parámetro crítico en la obtención de cafeína con asistencia de ultrasonidos. Este comportamiento puede atribuirse a que periodos más prolongados permiten una mayor difusión de los solutos desde la matriz vegetal hacia el disolvente, favoreciendo la transferencia de masa. Además, la presencia de ultrasonidos genera micro turbulencias y colapsos de burbujas que rompen progresivamente las paredes celulares vegetales<sup>22</sup>. Es notable que, a diferencia de extracciones por maceración, el ultrasonido permite alcanzar rendimientos máximos en tiempos considerablemente menores, demostrando su eficiencia energética<sup>23</sup>.

El incremento de la temperatura (de 30 a 60 °C) resultó en un aumento proporcional de la cantidad de cafeína extraída. Estos resultados concuerdan con algunos reportes donde al variar la temperatura de 30 a 50 °C obtuvieron mejores valores de cafeína en hojas de *I. guayusa*<sup>16</sup>. El aumento térmico favorece la transferencia de masa al reducir la viscosidad del disolvente y aumentar la energía cinética molecular, facilitando así la difusión del soluto desde la matriz vegetal hacia el medio de extracción<sup>24</sup>. A nivel molecular el incremento térmico altera la estructura tridimensional de los componentes celulares, destruyendo las interacciones que retienen la cafeína en los tejidos vegetales<sup>25</sup>. La termodinámica del proceso es capaz de explicar esta relación mediante el incremento de la constante de velocidad cuando se produce un aumento de la temperatura, siguiendo las propias leyes de Arrhenius<sup>26</sup>.

En investigaciones recientes<sup>27-29</sup> también se ha encontrado que la amplitud ultrasónica favorece la extracción de cafeína en diferentes fuentes vegetales. Estos resultados respaldan a los obtenidos en este estudio, donde este factor se incrementó de 20 a 60% mejorando de manera significativa la extracción de cafeína. Al aumentar la amplitud, se intensifica la formación y colapso de microburbujas, generando ondas de choque que rompen las estructuras celulares de las hojas y liberan los compuestos intracelulares. Simultáneamente, la mayor energía ultrasónica produce micro turbulencias en el disolvente que reducen la resistencia a la transferencia de masa, facilitando la difu-

sión de la cafeína desde la matriz vegetal al medio acuoso.

Uno de los factores que podría considerarse en futuras investigaciones es el tipo de disolvente, ya que la solubilidad de la cafeína varía en dependencia de la polaridad y concentración del disolvente utilizado; de hecho, se ha demostrado que una mezcla de etanol/agua (1:1) brinda mejores rendimientos de extracción en comparación con metanol y acetona<sup>30</sup>. Por otro lado, se ha indicado que la cantidad de cafeína extraída se estabiliza cuando alcanza su punto de saturación, en este momento la mayor parte de la cafeína hidrosoluble se ha desprendido del material vegetal<sup>31</sup>.

Otros autores han mencionado que, el efecto de los distintos factores de estudio en los procesos de transferencia de masa presenta una importante variabilidad que depende de las propiedades específicas del disolvente utilizado, los fenómenos de saturación que ocurren durante la extracción y la compleja composición estructural de las matrices vegetales<sup>16</sup>. Esta interacción de elementos lleva a que cada combinación de material y disolvente presente un comportamiento diferente, lo que impide establecer predicciones generalizadas sobre su desempeño en los procesos de extracción.

#### Análisis de la metodología de superficie de respuesta

Se empleó un diseño RSM, que incluyó 17 experimentos, para determinar los niveles óptimos de cada variable estudiada. La finalidad de la optimización fue encontrar las condiciones que maximicen la extracción de cafeína en las hojas secas de *I. guayusa*. Se analizaron cuatro modelos matemáticos (tabla 3) desarrollados mediante el *software Design Expert* y, los mejores resultados se consiguieron con el modelo cuadrático que mejoró de manera significativa los coeficientes de ajuste del modelo. Esta ecuación presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9903 lo cual indica que, el 99,03% de la variación en la extracción de cafeína, se debe a las variables de estudio.

Los resultados experimentales mostrados en la tabla 4, se utilizaron para construir el modelo cuadrático. Esta ecuación en función de factores reales puede escribirse de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Cafeína} = & -0,212 - 0,0025A + 0,0352B - 0,0103C \\ & - 0,00029AB + 0,00015AC - 0,00027BC \\ & + 0,0002A^2 + 0,0007B^2 + 0,0002C^2 \end{aligned}$$

donde A, B y C indican la amplitud, tiempo y temperatura de extracción, respectivamente.

**Tabla 3.** Modelos de optimización de cafeína de *I. guayusa*

Fuente	Secuencial p-valor	Falta de ajuste p-valor	R <sup>2</sup> -ajustado	R <sup>2</sup> -predicho	
Lineal	< 0,0001	0,0514	0,9374	0,9160	
2FI	0,3977	0,0456	0,9387	0,8964	
Cuadrático	0,0170	0,2193	0,9778	0,8962	<b>Sugerido</b>
Cúbico	0,4438	0,0014	0,8982	0,1497	



**Tabla 4.** Diseño experimental óptimo-combinado

Experimento	A: Frecuencia ultrasónica (%)	B: Tiempo (min)	C: Temperatura (°C)	Cafeína (%)
1	40	20	45	0,783±0,08
2	40	30	60	1,428±0,112
3	60	30	45	1,469±0,140
4	60	10	45	0,870±0,058
5	60	20	30	0,974±0,021
6	20	20	30	0,495±0,045
7	40	10	30	0,246±0,077
8	40	20	45	0,780±0,037
9	20	20	60	0,708±0,043
10	40	30	30	1,196±0,140
11	40	10	60	0,639±0,047
12	40	20	45	0,748±0,082
13	40	20	45	0,686±0,088
14	20	10	45	0,226±0,074
15	40	20	45	0,794±0,018
16	20	30	45	1,051±0,119
17	60	20	60	1,362±0,125

\* Los valores se expresaron como el promedio  $\pm$ desviación estándar para n=3.

El modelo cuadrático presentó un  $R^2$ -ajustado de 0,9778 y un  $R^2$ -predicho de 0,8962. La diferencia (0,0816) entre estos valores cumple con el criterio establecido en la literatura para modelos de superficie de respuesta, donde se considera aceptable una diferencia menor a 0,2<sup>17</sup>. Esta concordancia entre ambos coeficientes muestra que el modelo no presenta sobreajuste y que todas las variables incluidas contribuyen de manera significativa a la explicación del proceso de extracción. Los resultados experimentales de cafeína y los predichos por el modelo cuadrático se compararon y se presentan en la figura 2. La distribución de los puntos validó la idoneidad del modelo para representar todo el intervalo de datos experimentales, lo que indica que el modelo cuadrático puede aplicarse con éxito.

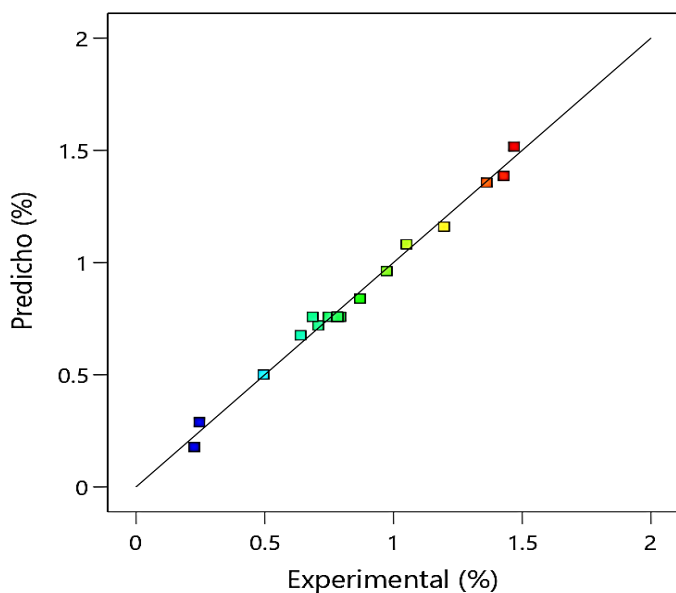
Los niveles óptimos de cada variable estudiada se determinaron a partir del análisis de las gráficas de superficie y de contorno (figura 3). Las mejores condiciones que brindaron la máxima extracción de cafeína fueron: amplitud ultrasónica 55,99%, tiempo 29,17 min y temperatura 58,88°C. En estas condiciones experimentales el contenido de cafeína fue de 1,56±0,12% lo que coincide con el valor predicho por el modelo cuadrático (1,589%). Estos resultados son inferiores a los encontrados en estudios previos<sup>32-34</sup>. Es importante recalcar que la cantidad de cafeína presente en las hojas de *I. guayusa* puede verse afectada por diferentes factores como la edad de la planta, las condiciones climáticas y las técnicas de extracción.

## Conclusiones

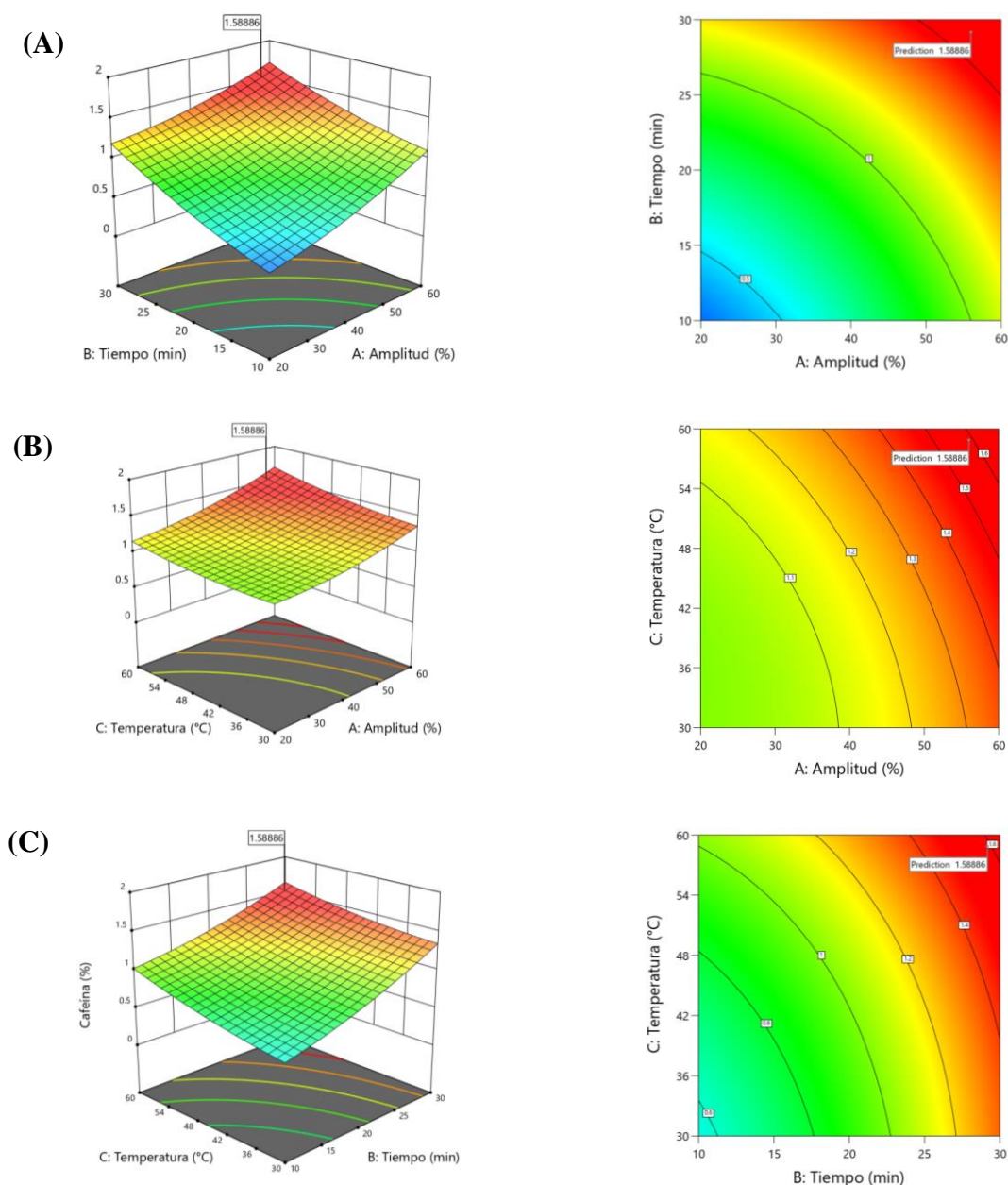
El tiempo fue el factor más influyente en la extracción de cafeína, seguido por la amplitud ultrasónica y temperatura. Mediante la metodología de superficie de respuesta se encontró las condiciones que maximizaron la extracción de cafeína, las cuales fueron: amplitud 55,99%, tiempo 29,17 min y temperatura 58,88 °C. El modelo matemático seleccionado fue el de grado dos y presentó el mejor ajuste con valor de  $R^2=0,9903$ . Los resultados del presente estudio pueden ser interesantes desde el punto de vista de encontrar una posible fuente de cafeína para aplicaciones en la industria alimenticia.

## Referencias

1. G Chianese, S Golin-Pacheco, O Tagliatalata-Scafati. Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Res. Int.*, 115, 504-510 (2020).
2. M Ochoa-Ocampo, Z Niño-Ruiz, R Torres-Gutiérrez, N Mogollón, K Diéguez-Santana. Characterization, biological



**Fig. 2:** Valores experimentales y predichos de cafeína.



**Fig. 3:** Los gráficos de superficie de respuesta (izquierda) y los gráficos de contorno (derecha), muestran el efecto del tiempo y la frecuencia a una temperatura de 58,88°C (A); la temperatura y la frecuencia a un tiempo de 29,17 min (B); la temperatura y el tiempo a una frecuencia de 55,99% (C) sobre la extracción de cafeína.

- activity and application trends of *Ilex guayusa* Loes: A systematic literature review and bibliometric analysis. **Food Chem. Adv.**, **7**, 100958 (2025).
- H Kelebek, H Sasmaz, O Aksay, S Selli, O Kahraman, C Fields. Exploring the Impact of Infusion Parameters and In Vitro Digestion on the Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) Tea Using Liquid Chromatography, Diode Array Detection, and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometr. **Foods**, **13**(5), 694 (2024).
  - G Wise, A Negrin. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, **60**(14), 2393-2404 (2020).
  - L Sequeda-Castañeda, LF Suárez-Carvajal, MA Téllez-Corral, SJ Gutiérrez-Prieto, HA Méndez-Pinzón. Evaluation of *Ilex guayusa* and *Piper marginatum* Extract Cytotoxicity on Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells. **Dent. J.**, **12**(6), 189. (2024).
  - E Shiguango, D Grefa. Fortalecimiento de ceremonia ancestral de la guayusa, para el fomento de turismo comunitario en la comunidad kichwa Atari, parroquia el Eno, provincia de Sucumbíos. **Rev. Científica Multidiscip. G-nerando**, **5**(1), 973-996-973-996 (2024).
  - G Paladines-Santacruz, A Orellana-Manzano, G Sarmiento. Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk. **Toxicol. Reports**, **8**, 747-752 (2021).
  - CR Mahoney, GE Giles, BP Marriott. Intake of caffeine from all

- sources and reasons for use by college students. **Clin. Nutr.**, **38(2)**, 668-675 (2019).
9. J Zhong, N Tang, B Asadzadeh, W Yan. Measurement and Correlation of Solubility of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in Water and Organic Solvents at Various Temperatures. **J. Chem. Eng. Data**, **62(9)**, 2570-2577 (2017).
  10. T Kopp, M Abdel-Tawab, B Mizaiakoff. Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: A review. **Toxins (Basel)**, **12(5)**, 7-10 (2020).
  11. C Wen, J Zhang, H Zhang. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrason. Sonochem.**, **48**, 538-549 (2018).
  12. A Carreira-Casais, P Otero, P Garcia-Perez. Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, **18(17)**, (2021).
  13. R Yakut. Response surface methodology-based multi-nozzle optimization for electrospray cooling. **Appl. Therm. Eng.**, **236**, 12-19 (2024).
  14. S Behera, H Meena, S Chakraborty. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of leaching parameters for ash reduction from low-grade coal. **Int. J. Min. Sci. Technol.**, **28(4)**, 621-629 (2018).
  15. Y Arteaga-Crespo, M Radice, LR Bravo-Sanchez, Y García-Quintana, L Scalvenzi. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. **Heliyon**, **6(1)**, e03043 (2020).
  16. SB Luna-Fox, JH Uvidia-Armijo, JL Rivera-Barreto. Kinetic study of solid-liquid extraction of caffeine in *Ilex guayusa* Loes. **Rev. Fac. Agron.**, **41(3)**, 1-6 (2024).
  17. M Anderson, P Whitcomb. RSM simplified: Optimizing processes using response surface methods for design of experiments. CRC Press, Second Ed., 22(128), 1-295 (2016).
  18. R Abreu-Naranjo, Y Arteaga-Crespo, LR Bravo-Sánchez, ML Pérez-Quintana, Y García-Quintana. Optimización de extraíbles totales a partir de corteza de *Maytenus macrocarpa* asistida por ultrasonido mediante metodología de superficie de respuesta. **Afinidad**, **77(590)**, (2020).
  19. L Qiao, W Tang, D Gao. UAV-based chlorophyll content estimation by evaluating vegetation index responses under different crop coverages. **Comput. Electron. Agric.**, **196**, 106775 (2022).
  20. NJ Peñafiel-Bonilla, SB Luna-Fox, Y García-Quintana, Y Arteaga-Crespo. Optimización de la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en hojas de *Annona muricata* L. mediante la metodología de superficie de respuesta. **Código Científico Rev. Investig.**, **4(2)**, 70-87 (2023).
  21. SB Luna-Fox, RR Álvarez-Castro, NJ Peñafiel-Bonilla. Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de *Ilex guayusa* Loes. **La Técnica**, **13(1)**, (2023).
  22. SA Siddiqui, A Ali-Redha, M Salauddin, IA Harahap, HPV Rupasinghe. Factors Affecting the Extraction of (Poly) Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, **55(1)**, 139-160 (2023).
  23. K Oravetz, Z Diaconeasa, R Carpa, E Rakosy-Tican, D Cruceriu. The Antioxidant, Antimicrobial, and Antitumor Properties of Flavonol-Rich Extracts from *Allium ursinum* (Wild Garlic) Leaves: A Comparison of Conventional Maceration and Ultrasound-Assisted Extraction Techniques. **Int. J. Mol. Sci.**, **25(23)**, 12799 (2024).
  24. Y Tao, P Wu, Y Dai. Bridge between mass transfer behavior and properties of bubbles under two-stage ultrasound-assisted physisorption of polyphenols using macroporous resin. **Chem. Eng. J.**, **436**, 135158 (2022).
  25. Y Yoo, YH Yoo, DY Lee, KH Jung, SW Lee, JC Park. Caffeine Produced in Rice Plants Provides Tolerance to Water-Deficit Stress. **Antioxidants**, **12(11)**, 1984 (2023).
  26. R Abishli, R Albarri, S Şahin. Mass transfer, kinetics, and thermodynamics studies during the extraction of polyphenols from *Feijoa sellowiana* peels. **J. Food Process Preserv.**, **45(9)**, e15736 (2021).
  27. SR Hassan, AM Al-Yaqoobi. Assessment of Ultrasound-Assisted Extraction of Caffeine and its Bioactivity. **J. Ecol. Eng.**, **24(3)**, 126-133 (2023).
  28. RA Carciocchi, V Dieu, P Vauchel, D Pradal, K Dimitrov. Reduction of environmental impacts of caffeine extraction from guarana by using ultrasound assistance. **Food Bioprod Process.**, **127**, 266-275 (2021).
  29. M Allameh, V Orsat. Effects of time, ultrasonic treatment and pH during extraction on l-theanine and caffeine yields from white tea leaves. **Future Foods.**, **9**, 100304 (2024).
  30. X Jun. Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. **J. Food Eng.**, **94(1)**, 105-109 (2009).
  31. A Vandepoosele, M Draye, P C, G Chatel. Study of Influential Parameters of the Caffeine Extraction from Spent Coffee Grounds: From Brewing Coffee Method to the Waste Treatment Conditions. **Clean Technol.**, **3(2)**, 335-350 (2021).
  32. S Cadena-Carrera, DP Tramontin, R Jacques, E Scapin, JM Müller, H Hense. Green-based methods to obtain bioactive compounds from *Ilex guayusa* Loes. using polar solvent. **Nat. Prod. Res.**, **37(18)**, 3103-3108 (2023).
  33. G Wise, D Santander. Assessing the History of Safe Use of Guayusa. **J. Food Nutr. Res.**, **6(7)**, 471-475 (2018).
  34. P Manzano-Santana, M Quijano-Avilés, I Chóez-Guaranda. Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín**, **71(3)**, 8617-8622 (2018).