





EXTRACTO LIOFILIZADO DE *ILEX GUAYUSA*: POTENCIAL INGREDIENTE PARA BEBIDAS ENERGIZANTES

FREEZE-DRIED EXTRACT OF *ILEX GUAYUSA*: A POTENTIAL INGREDIENT FOR ENERGY DRINK

Laura Scalvenzi*¹, Sting Luna Fox² y Matteo Radice¹

¹Universidad Estatal Amazónica. Departamento de Matemáticas y Ciencias Físicas. Puyo, Ecuador. [<https://ror.org/029ss0s83>]

²Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. [<https://ror.org/055eqsb67>]

*Autor para correspondencia: lscalvenzi@uea.edu.ec

Manuscrito recibido el 6 de febrero de 2025. Aceptado, tras revisión el 10 de julio de 2025. [Acceso Anticipado]

Resumen

El objetivo de este estudio es producir y analizar un extracto liofilizado de *Ilex guayusa*, con elevada concentración de cafeína y con potencial de uso como ingrediente de bebidas energizantes. La extracción de cafeína desde hojas secas se realizó mediante ultrasonido en medio acuoso. Los parámetros considerados fueron: tiempo, concentración de ácido cítrico, amplitud ultrasónica, relación sólido-líquido. Los factores significativos se optimizaron mediante un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken. Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y los metales pesados según la norma (Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013). La vida útil se determinó mediante pruebas aceleradas de temperatura. Los resultados mostraron que el tiempo, la concentración de ácido cítrico y la amplitud ultrasónica tuvieron efectos significativos sobre la extracción de cafeína, mientras que la relación sólido-líquido no fue significativa. Las condiciones óptimas para la extracción de cafeína fueron en un tiempo de 26.94 min, una concentración de ácido cítrico del 2.72%, una amplitud ultrasónica de 68.29% y una concentración de cafeína de 3.36%. Los parámetros fisicoquímicos del liofilizado fueron: humedad (1.2±0.1%), cenizas totales (11.87±0.12%), pH (5.1±0.2), solubilidad en caliente (17±1 s) y solubilidad en frío (1.8±0.2 minutos). Los niveles de metales pesados fueron: zinc (19.16±0.04 mg/kg), cobre (12.35±0.23 mg/kg) y estaño (8.64±0.17 mg/kg). La vida útil del producto liofilizado a 20 °C fue de 3.5 meses. El presente estudio proporciona información valiosa para el desarrollo de un producto liofilizado rico en cafeína.

Palabras clave: Ácido cítrico, cafeína, extracto acuoso, extracción con ultrasonido, optimización.

Abstract

The objective of this study is to produce and analyze a freeze-dried extract of *Ilex guayusa*, with a high caffeine concentration potentially used as ingredient in energy drinks. The caffeine extraction from dried leaves was done by ultrasound, using water as solvent. The parameters considered were time, citric acid concentration, ultrasonic amplitude, solid/liquid ratio. Significant factors were optimized using a Box-Behnken response surface design. Physicochemical parameters and heavy metals were performed according to (Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013). The shelf life was determined by accelerated temperature tests. The results showed that time, citric acid concentration and ultrasonic amplitude had significant effects on caffeine extraction, while the solid-liquid ratio was not significant. The optimum conditions for caffeine extraction were a time of 26.94 minutes, a citric acid concentration of 2.72%, an ultrasonic amplitude of 68.29% and caffeine concentration of 3.36%. The physicochemical parameters of the freeze-dried product were: moisture of $1.2\pm 0.1\%$, total ash of $11.87\pm 0.12\%$, pH of 5.1 ± 0.2 , hot solubility of 17 ± 1 s and cold solubility of 1.8 ± 0.2 minutes. The levels of heavy metals found were zinc (19.16 ± 0.04 mg/kg), copper (12.35 ± 0.23 mg/kg) and tin (8.64 ± 0.17 mg/kg). The shelf life of the freeze-dried extract at 20 °C was 3.5 months. This paper provides valuable information for developing a freeze-dried product rich in caffeine.

Keywords: Citric acid, caffeine, aqueous extract, ultrasound extraction, optimization.

Forma sugerida de citar: Scalvenzi, L., Luna, S. y Radice, M. (2026). Extracto liofilizado de *Ilex guayusa*: potencial ingrediente para bebidas energizantes. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 44(2):1-19. <https://doi.org/10.17163/lgr.n44.2026.05>. [Acceso Anticipado]

Orcid IDs:

Laura Scalvenzi: <https://orcid.org/0000-0001-6015-9871>

Sting Luna Fox: <https://orcid.org/0000-0001-6058-7024>

Matteo Radice: <https://orcid.org/0000-0002-4771-8912>

1 Introducción

Ilex guayusa Loes. es una planta de gran importancia cultural y medicinal en las regiones amazónicas de Ecuador, Perú, Colombia y Bolivia, donde crece en altitudes que varían entre los 200 y 2000 metros sobre el nivel del mar. Esta especie, que puede alcanzar alturas de hasta 30 metros, ha sido empleada durante siglos por los pueblos indígenas por sus diversas propiedades medicinales, que incluyen usos antifebriles, diuréticos, analgésicos y aplicaciones en el tratamiento de la artritis y la mejora de la fertilidad (Meneses y cols., 2024). Sin embargo, el uso más popular de *I. guayusa* se debe a su contenido estimulante, principalmente derivado de su alta concentración de cafeína, que supera el 3% en las hojas (Negrin y cols., 2019).

La creciente demanda global de productos naturales con propiedades funcionales ha impulsado el interés por *I. guayusa*, cuyas hojas no solo contienen cafeína, sino también una variedad de compuestos bioactivos, como antioxidantes, antiinflamatorios y antibacterianos (Cakmak y cols., 2023). Investigaciones recientes han identificado la presencia de teobromina, teofilina y ácidos clorogénicos, que aportan beneficios adicionales para la salud, además de la acción estimulante de la cafeína (Chianese y cols., 2019; Cadena-Carrera y cols., 2019). Entre los compuestos fenólicos detectados en los extractos de hojas de *I. guayusa*, se han identificado 14 compuestos, incluidos derivados del ácido clorogénico y flavonoides como la quercetina, lo que refuerza su potencial como ingrediente funcional en la formulación de nuevos productos (García-Ruiz y cols., 2017).

La extracción de cafeína se ha realizado tradicionalmente mediante varios métodos, entre los que se incluyen la extracción con disolventes orgánicos, la extracción por maceración y la extracción Soxhlet. Aunque estos métodos sean efectivos, muchos presentan desventajas significativas, como el uso de disolventes tóxicos, largos tiempos de procesamiento y altas temperaturas que pueden degradar los compuestos bioactivos (Ivanović y cols., 2020; Lezoul y cols., 2020). En los últimos años, se ha hecho énfasis en desarrollar técnicas de extracción más eficientes y ecológicas. La extracción asistida por ultrasonido (EAU) ha ganado popularidad debido a su capacidad para mejorar la eficiencia de

extracción mediante la cavitación acústica, un proceso que genera microburbujas en el medio líquido, lo que facilita la ruptura de las paredes celulares y la liberación de compuestos bioactivos como la cafeína (Kumar y cols., 2020).

La EAU ofrece varias ventajas sobre las técnicas convencionales, incluyendo tiempos de extracción más cortos, menores temperaturas y la posibilidad de utilizar disolventes más seguros, como el agua, lo que la convierte en una opción sostenible para la industria alimentaria y farmacéutica (Carreira-Casais y cols., 2021). Además, la combinación de ácido cítrico como acidificante mejora aún más la extracción de alcaloides, ya que en medios ácidos estos compuestos se liberan con mayor facilidad (Yang y cols., 2024). Esto hace de la EAU una técnica ideal para maximizar la extracción de cafeína desde las hojas de *I. guayusa*.

En paralelo, la creciente demanda de productos naturales y funcionales ha puesto de relieve la importancia de desarrollar alternativas saludables a las bebidas energizantes comerciales, que a menudo contienen aditivos sintéticos. Un producto liofilizado a base de *I. guayusa* no solo aprovecharía las propiedades bioactivas de la planta, sino que también respondería a las exigencias del mercado actual, que busca productos energéticos naturales que ofrezcan beneficios adicionales para la salud, como antioxidantes y compuestos antiinflamatorios. *I. guayusa*, debido a su contenido de cafeína y otros compuestos polifenólicos beneficiosos, representa una opción potencial para crear un producto innovador que pueda ser reconstituido como bebida energética. El objetivo del presente estudio es formular y evaluar el tiempo de vida útil de un producto liofilizado de *I. guayusa* destinado a la elaboración de una bebida energizante.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materia prima y preparación de la muestra

Las hojas de *I. guayusa* se adquirieron secas en el mercado de "Los plátanos" de la ciudad de Puyo, Ecuador, localizado en las coordenadas 1.4837° S y 78.0026° W (Laboratorio de Bromatología de la Universidad Estatal Amazónica, km 2 ½ vía Tena,

cantón y provincia de Pastaza.) Estas hojas se pulverizaron en un molino (marca KitchenAid, modelo BCG111OB) y fueron tamizadas hasta obtener un diámetro de partícula inferior a 0.5 mm. El ácido cítrico (pureza >99%) de grado alimenticio, utilizado para favorecer la extracción de cafeína, fue adquirido en la tienda de químicos "QUIMICOSAS" ubicada en la ciudad de Quito, Ecuador.

2.2 Extracción de cafeína con asistencia de ultrasonido

Se realizó una extracción sólido-líquido mediante baño de ultrasonido termostático (marca Wisd.23, modelo WUC-DO6H). Las extracciones se realizaron según las condiciones establecidas para cada experimento. Las muestras de *I. guayusa* pulverizada se pesaron en matraces de 200 mL y se adicionaron 100 mL de una disolución (m/v) de ácido cítrico disuelto en agua. Los matraces se colocaron en el equipo calibrado previamente a una temperatura constante de 50 °C. Los extractos obtenidos se filtraron usando papel Whatman N° 4. La determinación del contenido en cafeína se realizó de inmediato.

2.3 Determinación espectrofotométrica de cafeína

La determinación de cafeína se realizó mediante espectrometría, según la metodología empleada por (Luna-Fox y cols., 2024). 1 mL de NaOH (0.1 M) fue agregado a 10 mL de extracto acuoso de guayusa con el fin de aumentar el pH de la solución. La cafeína se extrajo en dos fracciones de 15 mL de cloroformo cada una. Los extractos obtenidos se combinaron y luego se evaporaron en un baño María. La cafeína resultante se disolvió en 50 mL de agua caliente (a una temperatura entre 60 y 90 °C) y se dejó enfriar. Posteriormente, la disolución se transfirió a un frasco de 100 mL, ajustando el volumen final con agua destilada. 5 mL de dicha disolución fueron dispuestos en un matraz aforado de 25 mL y se añadió 1 mL de HCl (0.01 M); posteriormente se completó con agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 275 nm en un espectrofotómetro UV-vis (marca Perkin Elmer, modelo Lambda 20) y se determinó la concentración utilizando la curva de calibración obtenida a partir

de nueve concentraciones (1, 2, 3, 5, 10, 12, 16, 20 y 25 mg/mL; $R^2=0,9991$), según la ecuación (1). Los resultados se expresaron en porcentaje con base en 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.

2.4 Diseño experimental

El experimento se realizó en dos etapas. En la fase inicial se utilizó un diseño factorial de dos niveles y cuatro factores (Tabla 1), que abarcó 36 experimentos: 16 ensayos con 2 réplicas cada uno y 4 repeticiones en el punto central, con el fin de evaluar la curvatura del modelo. Se analizó la influencia del tiempo de extracción, la concentración de ácido cítrico, la amplitud ultrasónica y la relación sólido/líquido sobre el contenido de cafeína en las hojas de *I. guayusa*. Para identificar las variables significativas y no significativas se empleó un diagrama de efectos estandarizados, mientras que la selección de las variables relevantes se consolidó mediante el diagrama de Pareto y el límite de Bonferroni (Anderson y Whitcomb, 2016).

En la segunda fase se analizaron las variables significativas para determinar los niveles óptimos de las variables estudiadas, con el fin de optimizar la extracción de cafeína. Para ello, se utilizó un diseño Box-Behnken (Metodología de Superficie de Respuesta - MSR) implementado mediante el software Design Expert versión 13.0.5.0 (versión de prueba, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.). Los resultados experimentales se ajustaron empleando el siguiente modelo polinómico de segundo orden:

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

Donde y indica la respuesta estimada, mientras que β_0 , β_{ii} y β_{ij} simbolizan los coeficientes de regresión vinculados a los términos medio, lineal, y cuadrático, respectivamente. Estos se determinaron a partir de los resultados experimentales, empleando el método de mínimos cuadrados. Las variables independientes x_i y x_j se codificaron en un intervalo de -1 a 1.

Tabla 1. Niveles de las variables estudiadas.

Variable de estudio	Código	Niveles		
		Bajo -1	Central 0	Alto 1
Tiempo (min)	A	15	22.5	30
Ácido cítrico (%)	B	0	1.5	3
Amplitud ultrasónica (%)	C	30	50	70
Relación sólido-líquido (m/v)	D	5	10	15

2.5 Validación del modelo

Para corroborar el modelo se examinaron las cifras de los coeficientes de R^2 ajustado y R^2 previsto. La validez de cada serie experimental, junto con la del modelo, fue comprobada a través de un análisis de varianza (ANOVA) (Dinardo y cols., 2019). La optimización de la extracción de cafeína de las hojas secas de *I. guayusa* se realizó teniendo en cuenta como factores independientes el tiempo de extracción, la concentración de ácido cítrico y la amplitud ultrasónica. Se establecieron las condiciones ideales de extracción empleando la ecuación predictiva de la metodología de superficie de respuesta.

2.6 Preparación del producto liofilizado

El producto liofilizado se obtuvo a partir del extracto acuoso obtenido bajo las condiciones óptimas de extracción, el cual fue procesado en un equipo liofilizador (marca SCANVAC, modelo COOLSAFE). Las condiciones de operación fueron: temperatura del condensador de -90 °C, presión de 0.105 Torr y un tiempo de procesamiento de 7 días.

2.7 Determinación de parámetros físico-químicos y metales pesados en el extracto liofilizado

Se analizó la humedad, el pH, la solubilidad en agua caliente y fría, contenido de cenizas totales y metales pesados (plomo, cadmio, zinc, cobre, arsénico y estaño), según los procedimientos establecidos por la norma técnica ecuatoriana (NTE) (Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013) perteneciente al café liofilizado. Los análisis se realizaron utilizando el espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Modelo A Analyst 800, dimensiones 1524.00 x 1016.00 x 812.80 mm, automático sampler AS800, peso 136.08 kg). Los resultados

de este estudio se compararon con los límites permisibles propuestos por la NTE (Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013) del café soluble, ya que es el producto que más se asemeja al obtenido en este estudio, además, no existe actualmente una norma INEN para *I. guayusa*. En la Tabla 2 se muestra el estándar empleado para cada análisis.

2.8 Determinación del tiempo de vida útil

La vida útil del extracto liofilizado se determinó mediante pruebas aceleradas de temperatura, considerando la humedad como parámetro de medición. Para ello, se pesó por triplicado 1 g de extracto liofilizado en recipientes de vidrio con tapa giratoria y se colocaron en una estufa (marca MEMMERT, modelo SFE700) a 30, 40 y 50 °C. El contenido de humedad se evaluó a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los datos se adaptaron a la ecuación diferencial (3) propuesta por Herrera y cols. (2022).

$$\frac{dH}{dt} = kH^n \quad (3)$$

Donde H es la humedad del extracto liofilizado, k representa la constante cinética de reacción, t indica el tiempo y n el orden de la reacción. Los resultados experimentales en este estudio siguieron una reacción de orden 1, por lo tanto, al integrar la ecuación (3) desde un contenido de humedad H_0 hasta H, y desde un tiempo inicial de 0 hasta t, se obtuvo la ecuación (4) que permitió determinar la vida útil del extracto liofilizado.

$$\ln(H) = \ln(H_0) + kt \quad (4)$$

La constante cinética de reacción (k) se determinó mediante la ecuación linealizada de Arrhenius (5) graficando $\ln(k)$ contra el inverso de la temperatura ($1/T$).

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

Donde k_0 es el factor pre-exponencial, E_a representa a la energía de activación (kJ/mol), R es la

constante universal de los gases (8.314 kJ/molK) y T la temperatura absoluta (K). La vida útil se estimó a una temperatura de 20 °C. Los datos se procesaron en el software Origin Pro 2022 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Tabla 2. Análisis fisicoquímicos y de metales pesados según la NTE INEN 1122:2013

Análisis	Método de ensayo
H (%)	NTE INEN-ISO 3726
CT (%)	NTE INEN 1117
pH	NTE INEN 389
SC (s)	Ensayo de taza
SF (min)	Ensayo de taza
Pb (mg/kg)	
Cd (mg/kg)	
Zn (mg/kg)	Espectrofotometría de absorción atómica
Cu (mg/kg)	
As (mg/kg)	
Sn (mg/kg)	

H: humedad, CT: cenizas totales, SC: solubilidad en agua caliente, SF: solubilidad en agua fría, Pb: plomo, Cd: cadmio, Zn: zinc, Cu: cobre, As: arsénico, Sn: estaño.

3 Resultados y Discusión

3.1 Efecto de los factores de estudio sobre la extracción de cafeína

La estimación de los efectos estandarizados, tanto positivos como negativos, en la EAU de cafeína se muestran en Figura 1A, donde las variables significativas corresponden con los valores más altos de los efectos estandarizados ($\geq 0,5$) según lo mencionado por Held y cols. (2023). Por otro lado, los efectos no significativos ($<0,5$) siguieron una distribución normal con una media de cero y variación constante. Esto indica que, al graficar los efectos en un gráfico de probabilidad normal, los efectos no significativos se ubican sobre una línea recta, mientras que los efectos activos se apartan de esa línea de normalidad.

El diagrama de Pareto, junto con el límite de Bonferroni, reforzaron la elección de los factores significativos. Como se indica en la Figura 1B, el tiempo de extracción (A), la concentración de ácido cítrico (B) y la amplitud ultrasónica (C), se ubicaron por encima del límite de Bonferroni, indicando que fueron variables significativas, y la relación sólido-líquido se ubicó por debajo de este límite, mostrando que no tuvo influencia estadística. Asimismo, según los resultados mostrados en la Tabla 3, se confirman las variables significativas ($p < 0.05$) y no significativas ($p > 0.05$). Las interacciones entre las variables estudiadas (A, B, C y D) tampoco fueron significativas. El modelo factorial presentó un buen ajuste, respaldado por un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.9934. Además, la diferencia entre el R^2 -ajustado (0.9881) y el R^2 -predicho (0.9757) fue menor a 0.2 lo cual se considera adecuada según Anderson y Whitcomb (2016) y Arteaga-Crespo y cols. (2019).

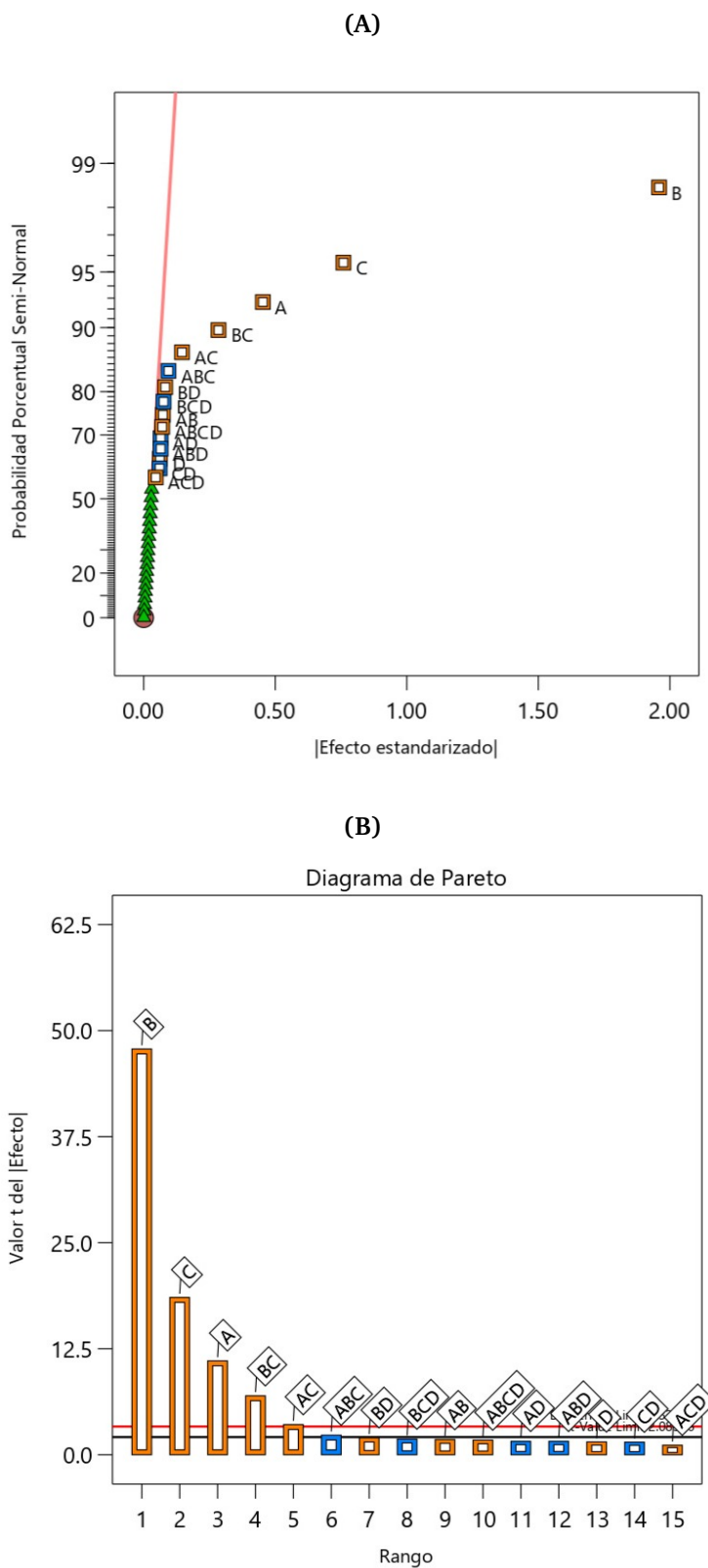


Figura 1. Efectos positivos (naranja) y negativos (azul) en la extracción de cafeína. Diagrama de distribución semi-normal (A), diagrama de Pareto (B).

Tabla 3. ANOVA para el efecto de los factores de estudio sobre la extracción de cafeína.

Cafeína	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor P	
Modelo	38.33	15	2.56	19.07	< 0.0001	Significativo
A-Tiempo	1.20	1	1.20	8.92	0.0076	
B-Ac. cítrico	30.56	1	30.56	228.07	< 0.0001	
C-Amplitud	3.74	1	3.74	27.91	< 0.0001	
D-Relación S/L	0.0004	1	0.0004	0.0028	0.9582	
AB	0.0025	1	0.0025	0.0189	0.8921	
AC	0.3026	1	0.3026	2.26	0.1493	
AD	0.0007	1	0.0007	0.0052	0.9435	
BC	0.3970	1	0.3970	2.96	0.1014	
BD	0.0055	1	0.0055	0.0412	0.8413	
CD	0.0003	1	0.0003	0.0019	0.9656	
ABC	0.0118	1	0.0118	0.0881	0.7699	
ABD	0.0007	1	0.0007	0.0052	0.9435	
ACD	0.0006	1	0.0006	0.0047	0.9459	
BCD	0.0033	1	0.0033	0.0244	0.8776	
ABCD	0.0019	1	0.0019	0.0141	0.9068	
Residual	2.55	19	0.1340			
Falta de ajuste	0.0042	1	0.0022	1.45	0.895	No significativo
Error puro	0.0170	18	0.0009			

Estudios previos han destacado la influencia positiva del tiempo de extracción y la amplitud ultrasónica en la extracción de cafeína, debido a su efecto en la ruptura celular y la transferencia de masa. Hassan y Yaqoobi (2023) observaron que un mayor tiempo y amplitud ultrasónica mejoraron significativamente el rendimiento en la EAU de cafeína en granos de café, ya que estos factores facilitan la liberación de este compuesto al aumentar la cavitación acústica. De manera similar, Serna-Jiménez y cols. (2023) reportaron una relación proporcional entre el tiempo de extracción y la recuperación de cafeína en pulpa de café, atribuyéndolo a un contacto más prolongado entre el disolvente y el material vegetal, factor que optimiza la solubilización de este alcaloide. El efecto significativo del ácido cítrico en la extracción de cafeína puede explicarse por su capacidad de acidificar el medio, optimizando la solubilidad y la liberación de cafeína. En medios ácidos, la interacción del disolvente con el material vegetal se fortalece, facilitando la extracción. Yang y cols. (2024) respaldaron esta observación al demostrar que un disolvente eutéctico compuesto de

polipropilenglicol, polietilenglicol y con ácido cítrico presentó una notable eficacia al extraer cafeína de residuos de té mediante irradiación con microondas, debido a que el entorno ácido favorece su solubilidad y extracción.

El factor relación sólido/líquido no mostró influencia estadística en la extracción de cafeína, esto puede explicarse debido a que, al incrementar este factor, la cantidad de disolvente utilizado no logró cubrir adecuadamente todo el material vegetal, limitando la transferencia de masa y reduciendo la eficiencia del proceso. Esto sugiere que, a partir de cierto límite, el disolvente disponible se vuelve insuficiente para extraer la cafeína de manera efectiva. Resultados similares fueron reportados por Abreu-Naranjo y cols. (2018), quienes encontraron que la relación sólida/líquido tampoco tuvo un efecto significativo en la extracción de compuestos bioactivos de la corteza de *Maytenus macrocarpa*, lo cual refuerza la idea de que este factor puede perder relevancia cuando no se optimiza la proporción de disolvente y material vegetal.

3.2 Optimización del proceso de extracción

Se utilizó un diseño de optimización con 17 experimentos para determinar los niveles óptimos del tiempo de extracción, concentración de ácido cítrico y amplitud ultrasónica, que fueron las variables significativas. El objetivo de la optimización del proceso de extracción fue determinar la mejor com-

binación de estas tres variables para maximizar la extracción de cafeína. Se analizaron cuatro modelos matemáticos (Tabla 4) generados por el software Design-Expert, donde el modelo cuadrático presentó los mejores resultados, con un valor R^2 igual a 0.9895. Este valor muestra que el 98.95% de la variación total en la extracción de cafeína, estuvo determinada por las variables estudiadas.

Tabla 4. Modelos matemáticos generados por el software Design-Expert

Modelo	p-valor	Falta de ajuste	R^2 -Ajustado	R^2 -Predicho	
Lineal	0.0014	0.0033	0.6153	0.4103	
2FI	0.5796	0.0023	0.5855	-0.0627	
Cuadrático	< 0.0001	0.3733	0.9761	0.9072	Sugerido
Cúbico	0.3733	0.0087	0.9793	-0.1258	

Tabla 5. Concentración de cafeína Corregido por vía experimental

Cafeína (%)	Tiempo (min)	Acido cítrico (%)	Amplitud (%)
3.24	22.50	3.00	70
3.08	30.00	1.50	70
2.68	15.00	1.50	70
2.64	30.00	3.00	50
2.61	22.50	1.50	50
2.50	22.50	1.50	50
2.50	22.50	1.50	50
2.45	22.50	1.50	50
2.36	22.50	1.50	50
2.22	15.00	3.00	50
2.15	30.00	1.50	30
1.98	15.00	1.50	30
1.88	22.50	3.00	30
1.60	22.50	0.00	70
1.37	22.50	0.00	30
1.22	30.00	0.00	50
0.98	15.00	0.00	50

El modelo cuadrático en términos de las variables de estudio fue el siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Cafeína} = & 0.66 + 0.10A + 0.62B - 0.03C \\ & + 0.40 \times 10^{-2}AB + 3.83 \times 10^{-4}AC \\ & + 9.42 \times 10^{-3}BC - 2.39 \times 10^{-3}A^2 \\ & - 2.60B^2 + 3.08 \times 10^{-4}C^2 \quad (6) \end{aligned}$$

Donde A, B y C representan el tiempo de extracción, la concentración de ácido cítrico y la amplitud ultrasónica respectivamente. Los resultados experimentales del contenido en cafeína se muestran en la Tabla 5 y los estimados por el modelo cuadrático fueron comparados en la Figura 2. La distribución de puntos validó la capacidad del modelo para abarcar todo el rango de experimentos analizados. Este patrón confirma la idoneidad del modelo para cubrir todo el intervalo de datos, sugiriendo que puede aplicarse con éxito.

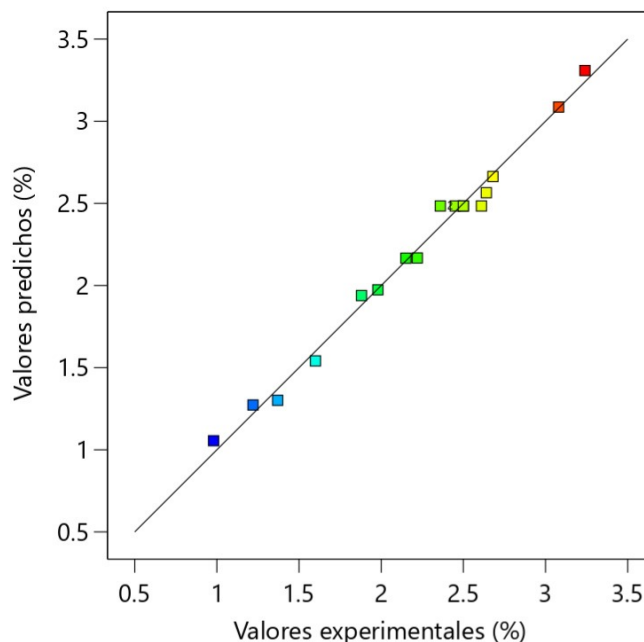


Figura 2. Resultados experimentales vs. predichos de cafeína

Las condiciones ideales de extracción, que resultaron en el máximo contenido de cafeína (3.36%), fueron las siguientes: tiempo de extracción de 26.94 minutos, ácido cítrico al 2.72% y amplitud ultrasónica de 68.29%. Bajo estas condiciones experimentales, el contenido de cafeína obtenido fue de 3.22, lo que coincidió con lo predicho por el modelo cuadrático.

La significancia estadística de la ecuación de regresión, correspondiente al modelo cuadrático de metodología de superficie, se evaluó mediante la prueba F y ANOVA, cuyos resultados se presentan en la Tabla 6.

El resultado de la prueba F de Fisher fue 75.53, con un valor p inferior a 0.0001, lo que demuestra que el modelo es altamente significativo. Además, el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9895, lo que refleja una alta concordancia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. El R^2 ajustado alcanzó un valor de 0.9761, lo que indica que el modelo cuadrático logró predecir el 97.61% de la variación en la extracción de cafeína. Por otra parte, la falta de ajuste no resultó estadísticamente significativa, con un valor F de 1.37 y un valor p de 0.3733. Estos resultados indican que la falta de ajuste no tuvo un impacto significativo en los resultados

obtenidos. Las representaciones gráficas de la ecuación cuadrática generadas por el software Design-Expert se muestran mediante una superficie de respuesta en 3D (Figura 3A) y gráficos de contorno en

2D (Figura 3B). Los niveles óptimos de las variables investigadas se determinaron a partir del análisis de estas gráficas.

Tabla 6. ANOVA para el modelo cuadrático de la MSR.

Cafeína	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor P		
Modelo	6.30	9	0.7001	73.53	< 0.0001	Significativo	
A-Tiempo	0.1891	1	0.1891	19.86	0.0029		
B-Ac. cítrico	2.89	1	2.89	303.76	< 0.0001		
C-Amplitud	1.30	1	1.30	136.13	< 0.0001		
AB	0.0081	1	0.0081	0.8508	0.3870		
AC	0.0132	1	0.0132	1.39	0.2771		
BC	0.3192	1	0.3192	33.53	0.0007		
A ²	0.0762	1	0.0762	8.00	0.0255		
B ²	1.44	1	1.44	151.09	< 0.0001		
C ²	0.0637	1	0.0637	6.69	0.0361		
Residual	0.0666	7	0.0095				
Falta de ajuste	0.0337	3	0.0112	1.37	0.3733		Not significant
Error puro	0.0329	4	0.0082				

$$R^2 = 0.9895; \text{ Adjusted } R^2 = 0.9761; \text{ Predicted } R^2 = 0.9071$$

El contenido de cafeína presente en las hojas secas de *I. guayusa* ha sido objeto de diversas investigaciones, con resultados que muestran variabilidad en la concentración de este compuesto. En un estudio reciente de Luna-Fox y cols. (2024), se reportaron niveles de cafeína que variaron entre 0.24% y 1.52% en extractos acuosos obtenidos mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido. Sin embargo, Cadena-Carrera y cols. (2022) encontraron un rendimiento superior ($2.27 \pm 0.05\%$) utilizando etanol como disolvente y la técnica de extracción con fluidos supercríticos. Esta diferencia en los

valores obtenidos puede atribuirse a varios factores, tales como el tipo de técnica de extracción, el disolvente utilizado, el tamaño de partícula del material vegetal y las condiciones ambientales. Investigaciones previas han indicado que variables como las condiciones climáticas y las características del suelo, como se observó en los estudios de Repajic y cols. (2021) y Mazumder y cols. (2020), también juegan un papel crucial en la concentración de compuestos bioactivos, lo que demuestra la complejidad de los factores que afectan la extracción de estos compuestos.

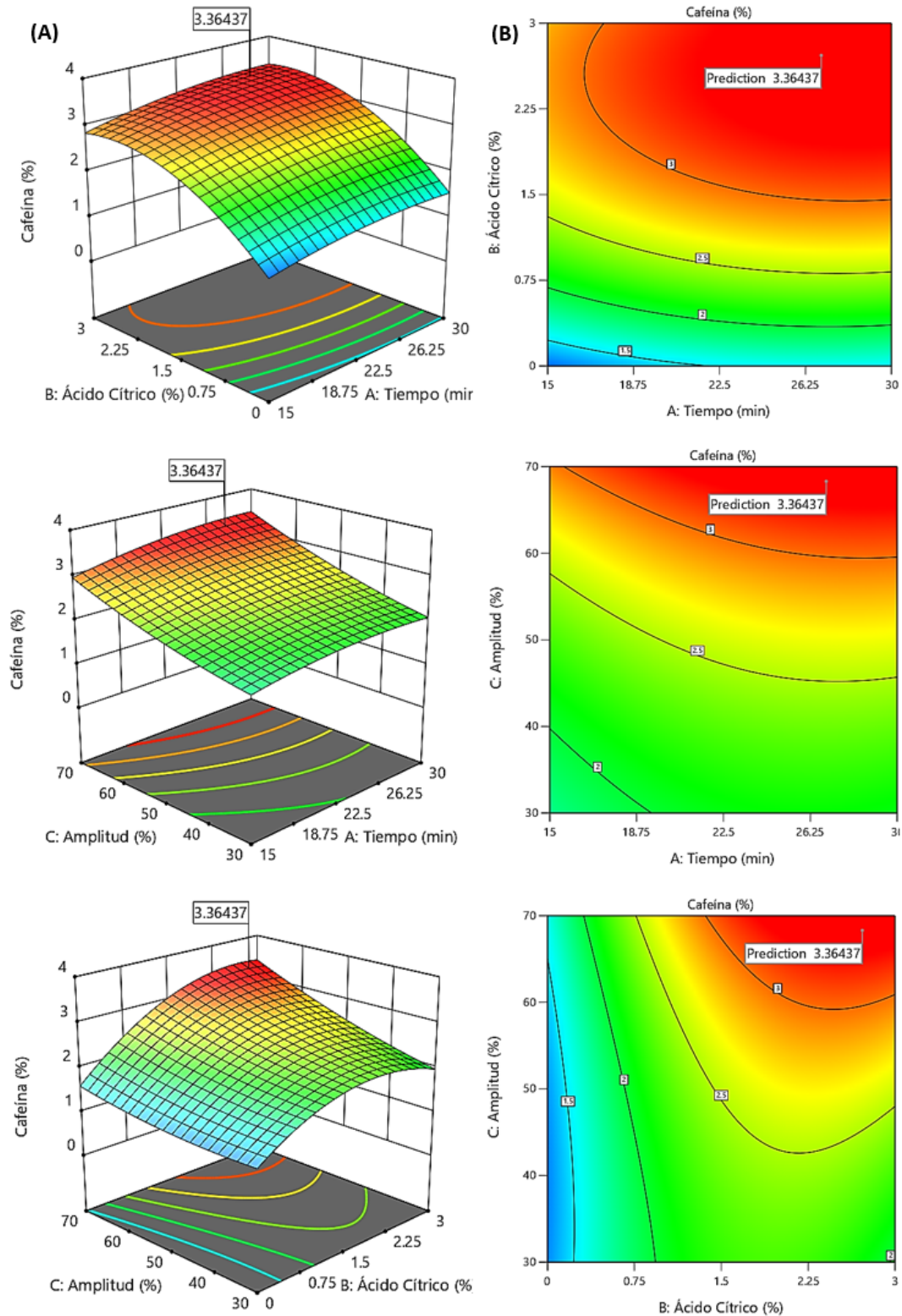


Figura 3. Condiciones óptimas de extracción de cafeína. Gráficos de superficie de respuesta (A), gráficos de contorno (B).

3.3 Parámetros fisicoquímicos del extracto liofilizado

El producto liofilizado se elaboró a partir del extracto acuoso obtenido en las condiciones óptimas de extracción definidas por el modelo cuadrático de la MSR. El extracto liofilizado fue procesado para asegurar que cumpliera con las especificaciones establecidas en la normativa NTE INEN 1122:2013 (2013) para el café liofilizado, la cual regula parámetros clave como el pH, la humedad, el contenido de cenizas totales y la solubilidad en agua caliente y fría.

En este estudio, los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros se ajustaron a las especificaciones de la normativa NTE INEN 1122:2013 (2013) (Tabla 7). El pH del extracto liofilizado fue de 5.1 ± 0.2 , lo que se encuentra dentro del rango permitido. La humedad fue de $1.2 \pm 0.1\%$, muy por

debajo del límite máximo de 3.5%, lo que indica un buen proceso de liofilización que asegura una baja actividad acuosa y una mayor estabilidad del producto. El contenido de cenizas totales fue de $11.87 \pm 0.12\%$, lo que refleja una correcta calidad del extracto sin presencia excesiva de impurezas minerales. En cuanto a la solubilidad, el extracto liofilizado mostró una buena capacidad de disolución, con un tiempo de solubilidad en agua caliente de 17 ± 1.0 s y en agua fría de 1.8 ± 0.2 min, valores que están por debajo de los límites establecidos por la normativa. Estos resultados reflejan la alta calidad del extracto liofilizado obtenido en las condiciones de extracción óptimas. Este cumplimiento normativo es un indicador importante de la idoneidad del proceso de extracción y liofilización, y sugiere que el extracto liofilizado producido tiene características que lo hacen adecuado para su comercialización y consumo, garantizando estándares de calidad y seguridad para el consumidor final.

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos aceptables según la NTE INEN 1122:2013 (2013).

Análisis	Extracto liofilizado de <i>I. guayusa</i>	Café liofilizado	
		Mínimo	Máximo
H (%)	1.2 ± 0.1	-	3.5
CT (%)	11.87 ± 0.12	-	14
pH	5.1 ± 0.2	4.7	5.5
SC (s)	17 ± 1	-	30
SF (min)	1.8 ± 0.2	-	3

H: humedad, CT: cenizas totales, SC: solubilidad en agua caliente, SF: solubilidad en agua fría

3.4 Contenido de metales pesados en el extracto liofilizado

La normativa NTE INEN 1122:2013 (2013) establece límites específicos para la presencia de metales pesados en el café liofilizado, con el fin de garantizar la seguridad y calidad del producto. Estos valores fueron utilizados como referencia para evaluar el contenido de metales pesados en el extracto liofilizado de *I. guayusa* en este estudio.

Los resultados obtenidos demostraron que el contenido de metales pesados en el extracto liofilizado cumplió estrictamente con los límites establecidos por la normativa (Tabla 8). En particular, los niveles de zinc, cobre y estaño fueron de 19.16 ± 0.04 mg/kg, 12.35 ± 0.23 mg/kg y 8.64 ± 0.17 mg/kg, respectivamente, todos por debajo del límite máximo permitido. Además, no se detectó la presencia de plomo, cadmio ni arsénico, lo que resalta la calidad y seguridad del producto.

Tabla 8. Valores máximos aceptables de metales pesados según la NTE INEN 1122:2013 (2013).

Metal analizado	Extracto liofilizado de <i>I. guayusa</i> (mg/kg)	Café liofilizado (mg/kg)
Pb	ND	1
Cd	ND	0.1
Zn	19.16±0.04	50
Cu	12.35±0.23	20
As	ND	0.5
Sn	8.64±0.17	20

Pb: plomo, Cd: cadmio, Zn: zinc, Cu: cobre, As: arsénico, Sn: estaño, ND: no detectado.

Diferentes estudios han indicado que la presencia de estos metales puede tener efectos tóxicos y acumulativos en el organismo. El plomo, por ejemplo, es un neurotóxico que puede afectar el sistema nervioso central, provocando trastornos cognitivos y de comportamiento, especialmente en niños (Sobin y cols., 2023). El cadmio se acumula principalmente en los riñones y puede causar daño renal, además de estar asociado con un mayor riesgo de cáncer en los pulmones y otros órganos (Howard y cols., 2023). En cuanto al arsénico, su exposición prolongada puede provocar problemas en la piel, el sistema respiratorio y aumentar el riesgo de desarrollar cáncer (Chappells y Dummer, 2024). Por otro lado, Yan y cols. (2023) han indicado que el zinc,

aunque es esencial en pequeñas cantidades para la salud, en niveles elevados puede interferir con la absorción de otros minerales y causar efectos adversos como náuseas, vómitos y disfunción hepática. El cobre, por su parte, es vital para funciones biológicas, pero en concentraciones altas puede dañar el hígado y el sistema nervioso (Min y cols., 2024). El estaño, aunque menos estudiado, en concentraciones altas puede causar malestares gastrointestinales y afectar la función renal (Liu y cols., 2022). En este estudio la ausencia de plomo, cadmio, arsénico y la baja concentración de zinc, cobre y estaño en el extracto liofilizado de *I. guayusa* destacan la seguridad y calidad del producto, minimizando cualquier riesgo para la salud de los consumidores.

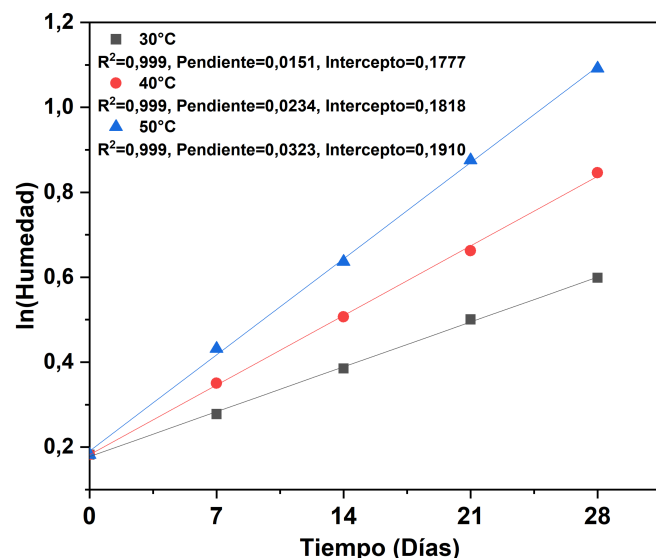


Figura 4. Relación entre ln (humedad) en función del tiempo de almacenamiento (días) del extracto liofilizado de *I. guayusa* a 30, 40 y 50 °C.

3.5 Determinación de la vida útil

La relación entre el contenido de humedad del extracto liofilizado y el tiempo se calculó mediante la gráfica del ln (humedad) en función del tiempo, de acuerdo con la Ecuación 4 (Figura 4). Los resulta-

dos mostraron un comportamiento consistente con una reacción de primer orden, lo cual fue confirmado por un coeficiente de determinación (R^2) de 0.999 para las curvas obtenidas a 30, 40 y 50 °C (Tabla 9). La constante de reacción cinética (k) estuvo representada por la pendiente de la recta en cada caso.

Tabla 9. Valores de k para las temperaturas de almacenamiento.

Temperatura (°C)	R^2	k	Intercepto
30	0.999	0.0151	0.1777
40	0.999	0.0234	0.1818
50	0.999	0.0323	0.1910

K: constante de reacción cinética

La temperatura tuvo una fuerte influencia en la constante de reacción cinética, reflejada en un aumento proporcional de su valor conforme se incrementaba la temperatura. Este comportamiento puede explicarse por el aumento en la energía cinética de las moléculas reaccionantes, lo que favorece un mayor número de colisiones efectivas, superando la barrera energética del proceso químico (Karral y cols., 2024). Esta tendencia es coherente con la ecuación de Arrhenius, la cual establece que la constante de reacción depende exponencialmente de la temperatura.

Resultados similares se reportaron por Isuiza y cols. (2018), quienes documentaron un incremento proporcional en la constante de reacción al aumentar la temperatura en procesos cinéticos similares. Estos autores concluyeron que este fenómeno era atribuible a la disminución de la energía de activa-

ción y al favorecimiento de la dinámica molecular del sistema.

La ecuación de Arrhenius linealizada se utilizó para calcular la energía de activación (Ea) y la constante de reacción cinética a una temperatura de 20 °C, con el fin de estimar la vida útil del extracto liofilizado. En la Figura 5 se presenta la relación entre el ln(k) y el inverso de la temperatura absoluta, donde los datos mostraron un buen ajuste, con un R^2 de 0.995.

La vida útil a 20 °C se calculó utilizando la Ecuación 4, tomando como parámetro crítico a la humedad según la normativa NTE INEN 1122:2013 (2013) para café liofilizado, que establece un límite máximo de humedad del 3.5%. La vida útil estimada se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Energía de activación, constante de reacción cinética a 20 °C y vida útil del extracto liofilizado.

Ea (kJ/mol)	k_0	k_{20}	H_0 (%)	$H_{m\acute{a}x}$ (%)	$t_{20^\circ C}$ (días)	$t_{20^\circ C}$ (meses)	Ecuación de orden uno empleada
30.097	3361.02	0.0101	1.2	3.5	106	3.5	$\ln(H) = \ln(H_0) + kt$

Ea: energía de activación, k_0 : factor pre-exponencial, $k_{20^\circ C}$: constante de reacción cinética a 20 °C, H_0 : humedad inicial del extracto liofilizado, $H_{m\acute{a}x}$: humedad máxima aceptable, $t_{20^\circ C}$: tiempo de vida útil del extracto liofilizado.

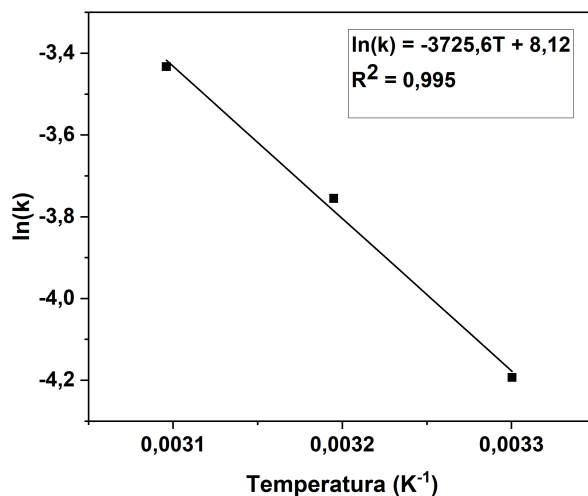


Figura 5. Relación entre la constante de reacción cinética (k) y el inverso de la temperatura absoluta.

Actualmente, no se han identificado investigaciones previas que determinan la energía de activación y la vida útil de un producto liofilizado a partir de extractos acuosos de hojas secas de *I. guayusa*.

Sin embargo, los estudios realizados en otros productos liofilizados ofrecen un marco de referencia para comparar los resultados obtenidos. Isuiza y cols. (2018) y López-Quiroga y cols. (2019) reportaron valores de energía de activación que oscilan entre 18.3 y 31.35 kJ/mol, un rango dentro del cual se encuentra la energía de activación determinada para el producto liofilizado de *I. guayusa* en este estudio. Este resultado indica un comportamiento energético comparable con otros productos liofilizados de origen vegetal.

En relación con la vida útil, los 106 días estimados para el extracto liofilizado de *I. guayusa* son similares a los reportados por González-Pérez y cols. (2024) para un producto elaborado a base de manzana (105 días). Este hallazgo posiciona al extracto de liofilizado de *I. guayusa* como un producto competitivo en términos de estabilidad durante el almacenamiento. Setiawan y cols. (2022) determinó una vida útil menor (59 días) para una bebida liofilizada a base de coco, lo que resalta la variabilidad en los tiempos de conservación entre productos liofilizados y pone en evidencia la influencia de factores como la composición química, los métodos de procesamiento y los materiales de embalaje.

Los resultados de esta investigación proporcionan un punto de partida para futuras investigaciones que busquen optimizar la estabilidad del liofilizado de *I. guayusa* y extender su tiempo de almacenamiento. Además, este estudio contribuye a llenar un vacío en la literatura, estableciendo parámetros clave para el desarrollo de productos innovadores a base de *I. guayusa*.

4 Conclusiones

La concentración de ácido cítrico fue el factor que más influyó en la extracción de cafeína a partir de hojas secas de *I. guayusa*, seguido de la amplitud ultrasónica y el tiempo de extracción. La relación sólido-líquido no mostró un efecto significativo.

Se elaboró un liofilizado a partir del extracto acuoso de *I. guayusa* obtenido bajo las condiciones óptimas de extracción. El producto final cumplió con los parámetros fisicoquímicos y los límites de metales pesados establecidos en la normativa NTE INEN 1122:2013 (2013).

Los resultados de la presente investigación brindan información valiosa para el desarrollo de un producto liofilizado rico en cafeína natural, posicionándolo como una alternativa potencial a los productos que utilizan cafeína sintética. Es necesario estudiar la estabilidad a largo plazo del producto

bajo diversas condiciones de almacenamiento para su viabilidad comercial.

Declaración de uso de inteligencia artificial

Los autores DECLARAN que, durante la preparación del artículo titulado «Extracto liofilizado de *Ilex guayusa*: potencial ingrediente para bebidas energizantes», no se utilizaron herramientas de inteligencia artificial generativa ni sistemas automatizados de asistencia para la redacción, análisis, interpretación de datos, generación de contenido, traducción o edición del manuscrito.

Los autores asumen plena responsabilidad por el contenido, la originalidad, la integridad y la versión final del artículo.

Contribución de los autores

L.S.: Conceptualización, Investigación, Escritura – borrador original, Escritura – revisión y edición.
S.L.F.: Análisis formal, Escritura – borrador original.
M.R.: Metodología, Administración de Proyecto, Escritura – borrador original, Escritura – revisión y edición.

Referencias

- Abreu-Naranjo, R., Arteaga-Crespo, Y., Bravo-Sanchez, L. R., Pérez-Quintana, M. L., y García-Quintana, Y. (2018). Response surface methodology for optimisation of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from *Maytenus macrocarpa* bark by means of ultrasound-assisted extraction. *Wood Science And Technology*, 52(5), 1359–1376. Online: <https://doi.org/10.1007/s00226-018-1034-x>
- Anderson, M. J., y Whitcomb, P. J. (2016). *RSM simplified*. Productivity Press eBooks. Online: <https://doi.org/10.1201/9781315382326>
- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., y Scalvenzi, L. (2019). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, 6(1), e03043. Online: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D. P., Cruz, A. B., Cruz, R. C. B., Müller, J. M., y Hense, H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, 104543. Online: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D. P., Jacques, R., Scapin, E., Müller, J. M., y Hense, H. (2022). Green-based methods to obtain bioactive compounds from *Ilex guayusa* Loes. using polar solvent. *Natural Product Research*, 37(18), 3103–3108. Online: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2140802>
- Cakmak, H., Ilyasoglu-Buyukkestelli, H., Sogut, E., Ozyurt, V. H., Gumus-Bonacina, C. E., y Simsek, S. (2023). A review on recent advances of plant mucilages and their applications in food industry: Extraction, functional properties and health benefits. *Food Hydrocolloids for Health*, 3, 100131. Online: <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100131>
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., ... Prieto, M. A. (2021). Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 18(17), 9153. Online: <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Chappells, H., y Dummer, T. (2024). Situating people and place in cancer prevention: Arsenic in drinking water in global to local context. En *Global perspectives on health geography* (pp. 243–267). Springer. Online: https://doi.org/10.1007/978-3-031-66413-7_10
- Chianese, G., Golin-Pacheco, S., Tagliatalata-Scafati, O., Collado, J., Munoz, E., Appendino, G., y Poillastro, F. (2019). Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Research International*, 115, 504–510. Online: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.005>
- Dinardo, A., Brar, H. S., Subramanian, J., y Singh, A. (2019). Optimization of microwave-assisted ex-

- traction parameters and characterization of phenolic compounds in yellow european plums. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97, 256–267. Online: <https://doi.org/10.1002/cjce.23237>
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A., y Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 97(12), 3929–3936. Online: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>
- González-Pérez, J. E., Jiménez-González, O., Romo-Hernández, A., Lóp-Malo, A., y Ramírez-Corona, N. (2024). Time-to-failure approach for estimating the shelf life of freeze-dried carotenoid-enriched apples: Forecasting the deterioration of quality properties for different packaging types and storage conditions. *ACS Agricultural Science & Technology*, 4(11), 1241–1249. Online: <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00465>
- Hassan, S., y Yaqoobi, A. A. (2023). Assessment of ultrasound-assisted extraction of caffeine and its bioactivity. *Journal Of Ecological Engineering*, 24(3), 126–133. Online: <https://doi.org/10.12911/22998993/157540>
- Held, S., Hildenbrand, A., Herdt, A., y Wachtmeister, G. (2023). Multiobjective metamodel-based design optimization—a review and classification approach using the example of engine development. *SAE Technical Papers*. Online: <https://doi.org/10.4271/2023-01-5026>
- Herrera, D. C. V., Mallea, C. L. B., Del Rosario Crisosto Fuster, A., y Marin, C. A. H. (2022). Estabilidad de bebida funcional de suero deslactosado con *Passiflora mollissima* en condiciones termales: Un estudio de vida útil. *Revista de Ingeniería (UPT)*. Online: <https://revistas.upt.edu.pe/ojs/index.php/ingenieria/article/view/648>
- Howard, J. A., Kuznietsova, H., Dziubenko, N., Aigle, A., Natuzzi, M., Thomas, E., ... Tillement, O. (2023). Combating lead and cadmium exposure with an orally administered chitosan-based chelating polymer. *Scientific Reports*, 13(1). Online: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28968-4>
- Ivanović, M., Razboršek, M. I., y Kolar, M. (2020). Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material. *Plants*, 9(11), 1428. Online: <https://doi.org/10.3390/plants9111428>
- Karal, M. A. S., Billah, M. M., y Ahamed, M. K. (2024). Determination of pore edge tension from the kinetics of rupture of giant unilamellar vesicles using the arrhenius equation: effects of sugar concentration, surface charge and cholesterol. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 26(7), 6107–6117. Online: <https://doi.org/10.1039/d3cp04451c>
- Kumar, K., Srivastav, S., y Sharanagat, V. S. (2020). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. Online: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Lezoul, N. E. H., Belkadi, M., Habibi, F., y Guillén, F. (2020). Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. *Molecules*, 25(20), 4672. Online: <https://doi.org/10.3390/molecules25204672>
- Liu, Y., Wang, S., Niu, X., Yin, M., He, Z., Hou, J., ... Luo, Y. (2022). Vertical distribution and health risk assessment of heavy metals in soils around tin ore areas in yunnan, china. *International Journal Of Environmental & Analytical Chemistry*, 1–14. Online: <https://doi.org/10.1080/03067319.2022.2128794>
- López-Quiroga, E., Prosapio, V., Fryer, P. J., Norton, I. T., y Bakalis, S. (2019). Model discrimination for drying and rehydration kinetics of freeze-dried tomatoes. *Journal Of Food Process Engineering*, 43(5). Online: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13192>
- Luna-Fox, S., Uvidia-Armijo, J. H., y Rivera-Barreto, J. (2024). Kinetic study of solid-liquid extraction

- of caffeine in *Ilex guayusa* Loes. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 41(3), e244128. Online: [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v41.n3.08](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v41.n3.08)
- Mazumder, K., Nabila, A., Aktar, A., y Farahnaky, A. (2020). Bioactive variability and in vitro and in vivo antioxidant activity of unprocessed and processed flour of nine cultivars of Australian lupin species: A comprehensive substantiation. *Antioxidants*, 9(4), 282. Online: <https://doi.org/10.3390/antiox9040282>
- Meneses, M. Á., Guzmán, J., Cabrera, J., Magallanes, J., Valarezo, E., y Guamán-Balcázar, M. D. C. (2024). Green processing of *Ilex guayusa*: Antioxidant concentration and caffeine reduction using encapsulation by supercritical antisolvent process. *Molecules*, 29(22), 5309. Online: <https://doi.org/10.3390/molecules29225309>
- Min, J., Sarlus, H., y Harris, R. A. (2024). Copper toxicity and deficiency: the vicious cycle at the core of protein aggregation in ALS. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 17. Online: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1408159>
- Negrin, A., Long, C., Motley, T. J., y Kennelly, E. J. (2019). LC-MS metabolomics and chemotaxonomy of caffeine-containing holly (*Ilex*) species and related taxa in the Aquifoliaceae. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 67(19), 5687–5699. Online: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07168>
- Repajić, M., Cegledi, E., Zorić, Z., Pedisić, S., Garofulić, I. E., Radman, S., ... Dragović-Uzelac, V. (2021). Bioactive compounds in wild nettle (*Urtica dioica* L.) leaves and stalks: Polyphenols and pigments upon seasonal and habitat variations. *Foods*, 10(1), 190. Online: <https://doi.org/10.3390/foods10010190>
- Serna-Jiménez, J., Torres-Valenzuela, L., Villarreal, A. S., Roldan, C., Martín, M., Siles, J., y Chica, A. (2023). Advanced extraction of caffeine and polyphenols from coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods. *LWT*, 177, 114571. Online: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114571>
- Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2013). *NTE INEN 1122:2013 – requisitos del café soluble* (Inf. Téc.). Servicio Ecuatoriano de Normalización. Online: <https://www.bing.com/search?q=NTE+INEN+1122%3A2013>
- Setiawan, B., Azra, J. M., Nasution, Z., Sulaeman, A., y Estuningsih, S. (2022). Development of freeze-dried coconut drink and its nutrient content, sensory profile, and shelf life. *Journal Of Culinary Science & Technology*, 22(4), 787–803. Online: <https://doi.org/10.1080/15428052.2022.2079578>
- Sobin, C., Gutiérrez-Vega, M., Flores-Montoya, G., Del Rio, M., Alvarez, J. M., Obeng, A., ... Hettiarachchi, G. (2023). Improving equitability and inclusion for testing and detection of lead poisoning in US children. *Milbank Quarterly*, 101(1), 48–73. Online: <https://doi.org/10.1111/1468-0009.12596>
- Yan, H., Li, S., Zhong, J., y Li, B. (2023). An electrochemical perspective of aqueous zinc metal anode. *Nano-Micro Letters*, 16(1). Online: <https://doi.org/10.1007/s40820-023-01227-x>
- Yang, Y., Guan, M., Fang, M., Gu, Y., Yi, L., y Ren, D. (2024). Simultaneous extraction and selective separation of catechins, caffeine and theanine from waste tea residue facilitated by citric acid-based deep eutectic solvent. *Separation And Purification Technology*, 130918. Online: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.130918>