

**DESARROLLO EXPERIMENTAL DE CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE TÉ
VERDE COMERCIAL CON ALTOS CONTENIDOS DE EGCG PARA
APLICACIÓN EN SALUD HUMANA**

Natalia Cerón Rojas

Daniela Osorio Vargas

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2024

**DESARROLLO EXPERIMENTAL DE CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE TÉ
VERDE COMERCIAL CON ALTOS CONTENIDOS DE EGCG PARA
APLICACIÓN EN SALUD HUMANA**

Natalia Cerón Rojas

Daniela Osorio Vargas

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR PARA EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA

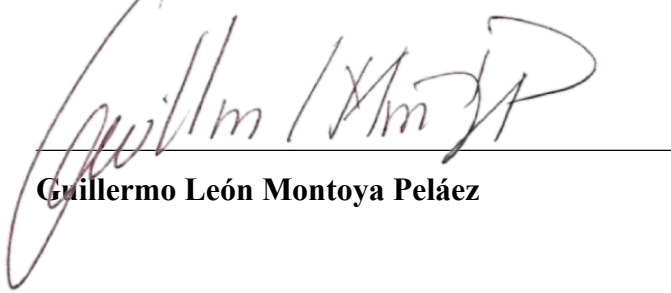
Guillermo L. Montoya P.
Profesor Asociado
Líder Investigación Aplicada & Desarrollo Tecnológico
Escuela de Industria Sostenible y Ciencias Aplicadas
Universidad Icesi

Santiago de Cali

2024

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del asesor:



Handwritten signature in red ink, reading "Guillermo León Montoya Peláez".

Guillermo León Montoya Peláez

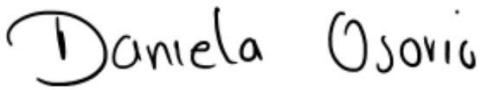
Firma del estudiante 1:



Handwritten signature in black ink, reading "Natalia Cerón R.".

Natalia Cerón Rojas

Firma del estudiante 2:



Handwritten signature in black ink, reading "Daniela Osorio".

Daniela Osorio Vargas

1. RESUMEN EJECUTIVO

El té verde se obtiene de la especie *Camellia sinensis* que posee altos contenidos de catequinas, las cuales tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Entre las más estudiadas se encuentra la epigallocatequina-galato (EGCG) pues se encuentra en mayor proporción, se considera el bioactivo más potente del té verde y por sus efectos antimicrobianos puede contribuir en la salud bucal.

Así pues, el objetivo del proyecto fue desarrollar las condiciones experimentales de extracción y secado para hojas de té verde premium, y así obtener altos contenidos de EGCG para su aplicación en una formulación magistral. Para lograrlo, se realizó un protocolo de extracción y secado de té verde premium que contuviera altos porcentajes de EGCG, lo cual se estableció al estandarizar un método analítico para su valoración; y por último, se evaluó la incorporación del té liofilizado en una formulación magistral, así como también su estabilidad con un estudio de degradación forzada.

Finalmente, el contenido de EGCG y cafeína fue de 1.58mg/g y 82.31 mg/g en el polvo de té verde, respectivamente; en los estudios de degradación forzada no se logró observar una disminución de la concentración a lo largo del tiempo ni la incorporación del té, pero después de cambios en la preparación de las muestras antes de ingresarlas al equipo para su valoración, se consiguió observar una leve degradación de EGCG. Por lo tanto, se lograron optimizar las condiciones de extracción de té verde y, a su vez, se consiguió evidenciar inconvenientes en el protocolo de la preparación del magistral.

Palabras clave: *Té verde, Catequinas, EGCG, Cafeína, Formulación magistral, Estudio de degradación forzada.*

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Té verde (*Camellia Sinensis*)

La especie *Camellia sinensis* se deriva en varios tipos de té, que son consumidos de forma masiva en el mundo. Las diferentes clases de té dependen del proceso de extracción de la planta; por ejemplo, el té blanco (hojas jóvenes) y el té verde (hojas maduras) no tienen un proceso de fermentación de sus hojas, a diferencia del té rojo o negro que, debido a su fermentación previa, tienen una acidez y color más intensos¹.

En este sentido, el proceso de extracción de té verde que no lleva un proceso de fermentación permite que, en este, se conserven las catequinas del té; unas moléculas pertenecientes al grupo de los polifenoles, a quienes se les ha atribuido propiedades antioxidantes. De esta forma, en el proceso de fermentación las catequinas pueden oxidarse a teaflavinas, lo cual reduce la capacidad antioxidante del té; por lo tanto, el té verde es una mejor opción en comparación con el té negro que no posee un contenido alto de catequinas².

Se debe agregar que el té verde puede tener otros efectos beneficiosos para la salud, como propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y algunas de sus moléculas pueden tener efectos antibacterianos, lo que contribuye a la preservación de la salud bucal y protección de la mucosa oral¹. Dichos efectos se logran por la actividad antioxidante de las catequinas, que pueden neutralizar los radicales libres de oxígeno y nitrógeno, y quelar iones metálicos en reacciones de oxido-reducción.

2.1.1. Marcadores del té verde

En el té verde, se destacan 4 catequinas: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) y epigalocatequina-3-galato (EGCG). Todas estas, pertenecen al grupo de los flavonoides, los cuales cuentan en su estructura con varios grupos hidroxilo (Figura 1) que se encargan de brindar la actividad antioxidante. Del mismo modo, es importante resaltar que las catequinas con un grupo pirogalol tienen un potencial antioxidante mayor que las que poseen un grupo catecol². Por otro lado, un marcador importante a considerar es la cafeína, ya que si bien tiene propiedades antioxidantes, su consumo en altas proporciones puede suponer algunos problemas de salud³.

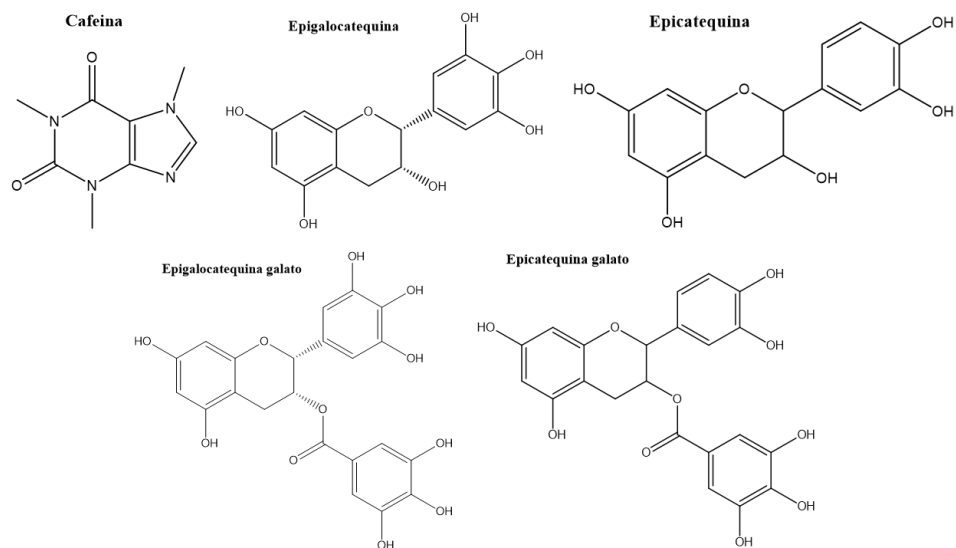


Figura 1. Principales marcadores del té verde.

Dentro de las catequinas, la EGCG es la más estudiada, pues se considera el bioactivo más potente del té verde, con mayor capacidad antioxidante e incluso, se le atribuyen propiedades antimicrobianas, especialmente, activo contra microbios asociados a enfermedades bucales. Para este caso en particular, la EGCG puede actuar como un destabilizante de membrana o puede interrumpir la síntesis de proteínas de algunas bacterias, resultando en una pérdida de su actividad biológica. Por otra parte, esta catequina se caracteriza por tener efectos anticancerígenos como inhibir la migración e invasión de células tumorales, inducir apoptosis e inhibir la proliferación de células tumorales¹.

2.1.2. Extracción de té verde

Para poder obtener en gran cantidad los marcadores de té verde se debe realizar un método de extracción para separar los polifenoles del material vegetal. Siendo así, una opción es la extracción sólido – líquido de té verde que permite que los componentes de una fase sólida se transfieran a una fase líquida; permitiendo la recuperación de catequinas⁴. En este sentido, para usar este método se deben tener en cuenta varios factores como el tipo de solvente, relación masa/solvente (p/v), tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción que pueden influir sobre la cantidad de polifenoles que se pueden obtener.

2.1.2.1. Tipo de solvente para la extracción de té verde

La solubilidad y la polaridad de las moléculas proporcionan una dificultad en la extracción, pues se deben usar solventes que tengan características similares para lograr un mayor

rendimiento en la concentración. El agua es uno de los solventes más usados debido a que es seguro para el consumo humano, es menos costoso, ecológico y fácil de manejar. Sin embargo, el agua es más eficiente para extraer compuestos polares; por lo que, los polifenoles, que tienen una menor polaridad, tienden a ser menos solubles en esta. Para estos casos se pueden usar disolventes orgánicos que pueden maximizar el rendimiento de extracción⁵.

En este sentido, uno de los solventes más efectivos es el etanol pues, a comparación de otros solventes orgánicos, no presenta gran toxicidad para el consumo humano y su contenido en extracciones se puede evaporar fácilmente debido a su bajo punto de ebullición, evitando dejar residuos. Algunos estudios han realizado comparaciones del uso de etanol y agua para extraer polifenoles de té verde; y se ha logrado evidenciar que el agua permite un porcentaje mayor de rendimiento total de la extracción y, en el caso del etanol, se obtiene un rendimiento más bajo. Aun así, lo interesante es que el porcentaje de catequinas es más elevado en la extracción con etanol; lo que permite inferir que el agua puede extraer más moléculas que no son relevantes para el estudio de los marcadores del té verde⁶.

2.1.2.2. Relación material vegetal/volumen de solvente

El porcentaje de polifenoles que se pueden obtener mediante una extracción pueden relacionarse con la cantidad de té verde y el volumen de solvente usados. Así pues, en la literatura se puede encontrar que para las extracciones se pueden usar relaciones de 1 g de material vegetal en 20 mL de solvente (1:20) o, incluso relaciones de 1:40. Tener una mayor cantidad de solvente puede generar un alto porcentaje de rendimiento en la extracción, pero no garantiza un alto contenido de los marcadores de té verde. Además, el uso de un gran volumen de solvente puede generar gastos energéticos mayores y hacer más largos los procesos de evaporación⁶.

2.1.2.3. Tamaño de partícula de material vegetal

El proceso de molienda del material vegetal puede hacer más eficiente la extracción al reducir el tamaño de partícula. En el caso del té verde, se pudo encontrar resultados en artículos que sugieren que a medida que se reduce el tamaño de partícula, la cantidad de polifenoles extraídos tiende a aumentar. No obstante, esto sucede hasta cierto punto, pues un tamaño de partícula demasiado pequeño hace que se formen aglomerados impidiendo una transferencia

eficiente del material sólido al solvente⁷. Por otro lado, se evidenció que el porcentaje de polifenoles obtenidos de una muestra de té sin moler, si bien no fue el mayor, se evidenció un resultado significativo. Por lo tanto, se puede hacer una extracción de té verde sin modificar su tamaño y evitar procesos adicionales de molienda garantizando una buena cantidad de polifenoles en la extracción⁷.

2.1.2.4. Temperatura y tiempo de extracción

La temperatura y el tiempo tienen relevancia en la extracción por la estabilidad de las moléculas, por ejemplo, algunos compuestos pueden ser termolábiles o tener degradación si se exponen en medio líquido durante un tiempo prolongado. De esta forma, se ha indicado que las temperaturas altas, pero no mayores que 80°C, resultan en un mayor porcentaje de polifenoles de la extracción de té verde a un tiempo óptimo de aproximadamente 1 hora. Aunque, al utilizar un solvente con un punto de ebullición tan bajo como el etanol, se hace necesario disminuir la temperatura de extracción para evitar una evaporación masiva del solvente y, con ello, una sobresaturación de material vegetal. Aun así, también se puede evidenciar que a una temperatura de 60°C se obtiene una alta concentración de polifenoles si se realiza a un tiempo óptimo de 1 – 2 horas de extracción⁷.

2.1.3. Secado de té verde

Para obtener un polvo de extracto de material vegetal, se debe tener en cuenta si las moléculas son termolábiles, pues la mayoría de los métodos de secado suponen usar temperaturas elevadas. Teniendo en cuenta esto, dado que los polifenoles son termosensibles, se puede usar el secado por liofilización, que consiste en congelar la muestra de vegetal para, posteriormente, ser sublimada a bajas presiones; lo que permite retirar el líquido del extracto y obtener un producto seco. Esta técnica posee ventajas que se pueden resaltar en la industria alimenticia, pues al congelar el agua se detienen los procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos, por lo que la calidad del extracto y sus propiedades se mantienen⁸.

2.1.4. Valoración de marcadores de té verde

Para el estudio de los polifenoles presentes en el extracto de té verde, es necesario realizar un proceso de análisis cualitativo y cuantitativo. El primero va a permitir la identificación de las catequinas presentes en el extracto y para esto se puede usar la tecnología HPTLC (cromatografía en capa fina de alto rendimiento); la cual permite observar el aislamiento de

moléculas mediante su afinidad a una fase móvil (líquida) y una estacionaria (placa). Entonces, como las moléculas pueden tener diferentes tipos de afinaciones entre sí, se sitúan en lugares distintos en la placa cromatográfica, permitiendo su caracterización⁹.

Por otra parte, para el segundo análisis se requiere de un método con alta eficiencia y resolución como el UHPLC – MS (cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a espectrometría de masas) que puede permitir una cuantificación precisa de las catequinas presentes en el extracto. Estas concentraciones van a permitir suponer el efecto del té verde, bien sea beneficioso o tóxico; garantizando así una optimización de las propiedades de la planta y un control en sus posibles impactos negativos en los consumidores¹⁰.

2.2. Aplicaciones en salud humana

2.2.1. Cáncer de cuello y cabeza (HNC)

A nivel mundial, el HNC es el séptimo cáncer más común y, usualmente, se desarrolla en el revestimiento epitelial de la cavidad bucal, laringe y faringe¹¹. Este cáncer se puede tratar con técnicas como la radioterapia, que es un tratamiento usado en pacientes con cáncer basado en el uso de radiaciones ionizantes que activan la producción de radicales libres que provocan la rotura de las cadenas de ADN de las células, lo que induce la muerte de la célula en la fase mitótica o, bien, el daño es suficiente para que sufra una apoptosis. Sin embargo, esta terapia puede alterar el funcionamiento de células sanas en el paciente, sobre todo, a las que proliferan rápidamente; y puede inducir, una ruptura de la barrera protectora, de la piel y las mucosas del tracto gastrointestinal¹².

De esta manera, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, se pueden obtener complicaciones relacionadas con la piel, las mucosas y glándulas salivales, donde se manifiesta mucositis, prurito, hipersensibilidad y dolor; todo esto producto de la inflamación y eritema que se dan como respuesta a la radiación. Por lo tanto, es muy común que los pacientes con cáncer de cuello y cabeza tengan dificultades para su alimentación e higiene bucal¹². Es por esto por lo que el extracto de té verde puede ser una vía de tratamiento para mitigar estos efectos adversos a partir de las propiedades que se han mencionado anteriormente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar las condiciones experimentales de una extracción de té verde premium para la obtención de altos contenidos de EGCG para su aplicación en una formulación magistral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Objetivo específico 1

Desarrollar un protocolo de extracción y secado de té verde con altos contenidos del marcador epigallocatequina-galato.

3.2.2. Objetivo específico 2

Establecer un método analítico para la valoración del marcador epigallocatequina-galato en el polvo de extracto de té verde.

3.2.3. Objetivo específico 3

Evaluar la degradación de la EGCG del extracto de té verde implementado en una formulación magistral tipo enjuague bucal.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos y materiales

- Té verde: Se obtuvo el material vegetal premium denominado Bitaco TE VERDE NEEDLES por medio de la empresa AGRICOLA HIMALAYA S.A. Las hojas de té verde se encontraban en presentación de bulto por 25kg dentro de una bolsa de aluminio con revestimiento de cartón, por lo cual, se necesitaron dos bultos.
- Columna de UPLC: La columna de UPLC se obtuvo de la empresa Agilent, comprendiendo las siguientes características: Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 de 2.1x100 mm y de 1.8µm, para uso a alta presión (presión máxima: 600 bares, 9000 psi).
- El estándar secundario de EGCG: se obtuvo de Merck KGaA en presentación de un vial por 1g en vidrio de color ámbar, el número de CAS de 989-51-5 y la referencia del producto es PHR1333-1G.
- Etanol al 96%: Se adquirió etanol puro para grado alimenticio directamente con Sucroal y cuyo certificado de análisis garantiza contenidos dentro de las especificaciones para acidez, metanol, impurezas, acetaldehído, alcoholes superiores, etc.

4.2. Ensayos preliminares: Optimización de los procesos de extracción

Para poder realizar la extracción de manera efectiva, primero fue necesario evaluar las condiciones de extracción óptimas.

En primer lugar, se determinó si el tamaño de partícula de las hojas de té verde puede afectar la extracción, para ello, se tomó en cuenta el material sin moler y además se trituraron muestras del té verde en una licuadora industrial y se pasaron por malla #10, #20 y #40. En segundo lugar, fue necesario determinar qué tipo de solvente extrae la mayor cantidad de catequinas, por lo cual, se realizaron extracciones en agua, etanol al 96% y agua: etanol 1:1. Así mismo, se evaluaron diferentes relaciones peso/volumen para identificar una relación que permitiera una extracción eficaz, un bajo uso de solvente para reducir costos y que posibilitara el secado de té en las instalaciones de la universidad (el secado se realizó primero por rotaevaporador y para eliminar el exceso de humedad se terminó por liofilizador).

Por último, se realizó un análisis cualitativo de las catequinas por medio de TLC, y un análisis cuantitativo en UPLC-MS, específicamente de la EGC, EC, EGCG y ECG. Cabe resaltar, que también se cuantificó la cafeína, pero no como marcador del té verde, sino para controlar las concentraciones de ésta y encontrar un valor aceptable para los pacientes.

4.3. Extracción de té verde

Una vez determinadas las mejores condiciones de extracción, se realizó un escalamiento en la planta piloto biorreactor continuo de la Universidad Icesi. Para esto, se utilizaron 10kg de té verde a una relación 1:3p/v, etanol al 96% como solvente y el material sin moler. La configuración del equipo durante la extracción fue: temperatura de extractor de 55°C aproximadamente, sin recirculación de solvente y agitación constante a 45rpm. El proceso se realizó durante 1 hora y finalizado dicho tiempo, se llevó al equipo de ultrafiltración para eliminar las partículas sólidas del té verde pasando por tamaño de poro de 100µm. El proceso anterior fue el mismo para la extracción de 37.5kg de té verde.

4.4. Secado del extracto de té verde

Debido a que la extracción se realizó con etanol al 96%, primer fue necesario utilizar el evaporador de la planta piloto de la Universidad Icesi para reducir significativamente el volumen de solvente, y posteriormente se llevó al destilador para continuar con la reducción de la cantidad de etanol. Ahora bien, a pesar de que se redujo aproximadamente en un 90%

el solvente, fue necesario retirar todo el etanol remanente, para ello se terminó de eliminar con el rotaevaporador a escala laboratorio.

Así mismo, como el etanol que se utilizó estaba al 96% y el restante 4% de la solución es agua, se requirió remover el agua excedente, por ende, se congelaron las muestras a -20°C para así llevarlas al liofilizador hasta desecación. Posteriormente, el polvo obtenido se llevó a -20°C para evitar su degradación en el proceso.

4.5. Estudio de degradación forzada de la formulación magistral

El estudio de degradación forzada comprendió 4 temperaturas, las cuales fueron 4, 30, 40 y 60°C y, se desarrolló en la cabina de estabilidad ubicada en la Universidad Icesi. Es importante resaltar que, cada temperatura para cada uno de los puntos de muestreo tuvo 3 réplicas. Además, debido a que la duración del estudio fue de un mes, se tuvieron en cuenta los siguientes tiempos o puntos de muestreo: T0, T2, T4, T8, T15, T21 y T30; donde el número acompañado a la “T” corresponde al día del mes, siendo así, T0 el día en el cual se inició el estudio, T2 el día 2 del estudio, y así sucesivamente. Lo anterior se puede observar en la tabla 2 y la formulación cuantitativa se presenta en la tabla 3.

Cabe resaltar que, para poder tener una lectura homogénea de los resultados, las muestras que se iban obteniendo a lo largo del estudio, fueron dispuestas en la nevera de -20°C , y una vez se terminó, se centrifugaron las muestras a 6000rpm y se realizó la cuantificación de EGCG (junto con las demás catequinas) y cafeína por medio de UPLC-MS.

Tabla 2. Sistema de muestras para el estudio de degradación forzada de la formulación magistral.

Temperaturas	4°C	30°C	40°C	60°C
T0	M1			
	M2			
	M3			
T2	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3
T4	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3
T8	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2

	M3	M3	M3	M3
T15	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3
T21	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3
T30	M1	M1	M1	M1
	M2	M2	M2	M2
	M3	M3	M3	M3

Tabla 3. Formulación cuantitativa para la preparación de muestras para el estudio.

Componente	Porcentaje (%)	Cantidad (g) para cada muestra	Cantidad (g) para cada lote	Cantidad (g) total para el estudio
Té verde (liofilizado)	5	0.25	7.5	22.5
CMC (carboximetilcelulosa)	0.5	0.025	0.75	2.25
Benzoato de sodio	0.1	0.005	0.15	0.45
Sacarosa	40	2	60	180
Agua destilada	54.4	2.28	81.6	244.8
Total	100%	5	150	450

Ahora bien, debido a que cada muestra contuvo 5g de la formulación y el té verde es fotosensible, fue necesario utilizar recipientes que protegieran al producto de la luz, de forma que la degradación solo se presentara por el efecto de la temperatura. Del mismo modo, dentro de una cabina de bioseguridad de la Universidad Icesi se prepararon los lotes de la formulación de la siguiente manera:

1. En un vaso de precipitación adicionar la sacarosa y disolver con 60g de agua.
2. En otro vaso de precipitación adicionar la C.M.C y disolver con 10g de agua hasta homogenización y formación del gel.
3. Luego adicionar el té verde lentamente y con agitación hasta disolución al vaso que contiene la sacarosa disuelta.
4. En un vaso de precipitación adicionar el benzoato de sodio y disolver con 11.6g de agua.
5. Adicionar al vaso que contiene la mezcla de té verde + sacarosa disuelta, la C.M.C disuelta mezclando con un agitador hasta homogenización, simultáneamente adicionar el benzoato disuelto.

6. Envasar colocando en cada uno 5g de la preparación final.
7. Rotular los frascos con las etiquetas correspondientes.

Cabe resaltar que, la formulación del estudio de degradación forzada se basó del estudio clínico TV5M01-889-02, el cual se encuentra en curso en la Fundación Valle del Lili, sin embargo, por cuestiones de confidencialidad se cambiaron algunos compuestos y se omitieron otros.

4.6. Cuantificación por Ultra performance liquid chromatography (UPLC) acoplado a Espectrometría de masas (MS)

La cuantificación de las catequinas y la cafeína se realizó por medio de UPLC con detector de UV-Vis de arreglo de fotodiodos en serie PDA (Tabla 4) y el rango de longitud de onda fue entre 210 – 400nm. Debido a que la muestra se trataba de un extracto, fue necesario realizar la cuantificación por espectrometría de masas para medir las moléculas de interés individualmente, así pues, se configuró el equipo (Tabla 4) para que reconociera los pesos moleculares de cada una de las moléculas.

Tabla 4. Configuración método cuantitativo UPLC – MS

Configuración método cromatográfico			
Cromatógrafo de líquidos UPLC Waters ACQUITY	Columna: Zorbax Eclipse Plus C18 HD 2.1x100mm 1.8µm		
	Temperatura columna: 35°C		
	Fase móvil:		
	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido fórmico 0.1% en agua tipo I (A) • Ácido fórmico 0.1% en metanol (B) 		
	Método elución:		
	Tiempo (min)	A	B
	0	95	5
	2.0	20	80
	2.1	2	98
	2.5	2	98
	2.6	95	5
	5.0	95	5

	Tiempo de corrida: 5min
	Velocidad de flujo constante: 0.500mL/min
	Volúmen de inyección: 2 μ L
	Temperatura del automuestreador: 10°C
Configuración método de ionización	
Espectrómetro de masas WATERS SQR2	Cafeína \rightarrow ESI + SIR 1: 195 m/z EGCG \rightarrow ESI – SIR 2: 457 m/z EGC \rightarrow ESI – SIR 3: 305 m/z ECG \rightarrow ESI – SIR 4: 441 m/z EC \rightarrow ESI – SIR 5: 289 m/z
	Dwell: 0.023s Voltaje capilar: 3.0kV Voltaje cono: 30V Temperatura de la fuente: 150°C Temperatura de solvatación: 600°C Flujo de solvatación: 900L/hr
<i>Sistema de manejo de datos Masslynx – Código de equipo: LIQUPL – 001</i>	

Ahora bien, para realizar la lectura de las muestras en el equipo fue necesario preparar una curva de calibración de los estándares EGCG y cafeína en el mismo vial con las siguientes concentraciones: 25, 50, 100, 250, 500, 800, 1000, 1500 y 2000ppb. Para las muestras del polvo del extracto de té verde se preparó una solución de 5mg en 50mL y para las formulaciones magistrales una solución de 250mg en 50mL, se filtraron todas las muestras por membrana de 0.22 μ m y se llevaron al vial con un volúmen de 1mL. Cabe resaltar que, el solvente utilizado para cada una de las preparaciones fue la fase móvil agua tipo 1: acetonitrilo 9:1 sin ácido fórmico.

4.7. Estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la formulación magistral

Debido a problemas que resultaron del estudio de degradación forzada, fue necesario realizar un experimento modificando el proceso de elaboración de la formulación magistral para garantizar la incorporación del té verde dentro de la misma. Para esto, la lectura de los

resultados se realizó de manera similar al numeral 4.5 (se dispusieron las muestras a -20°C hasta su análisis) y también se utilizaron los mismos equipos y recipientes. En este caso, se evaluaron 3 temperaturas (25, 60 y 80°C) donde cada una comprendía de 2 réplicas, el tiempo del estudio fue de 72 horas y los tiempos de muestreo fueron T0, T4, T7, T10, T24, T48 y T72, siendo esta vez T0 la hora en la cual se finalizó la preparación de la formulación, T4 la hora 4 del estudio, y así sucesivamente. Lo anterior se puede observar en la tabla 5 y la formulación cuantitativa se presenta en la tabla 6.

Tabla 5. Sistema de muestras para el estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la formulación magistral.

Temperaturas	25°C	60°C	80°C
T0	M1		
	M2		
T4	M1	M1	M1
	M2	M2	M2
T7	M1	M1	M1
	M2	M2	M2
T10	M1	M1	M1
	M2	M2	M2
T24	M1	M1	M1
	M2	M2	M2
T48	M1	M1	M1
	M2	M2	M2
T72	M1	M1	M1
	M2	M2	M2

Tabla 6. Formulación cuantitativa para la preparación de muestras para el estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la preparación magistral

Componente	Porcentaje (%)	Cantidad (g) para cada muestra	Cantidad (g) para cada lote	Cantidad (g) total para el estudio
Té verde (liofilizado)	5	0.25	7.5	15
CMC (carboximetilcelulosa)	0.5	0.025	0.75	1.5
Benzoato de sodio	0.1	0.005	0.15	0.3
Fructosa	40	2	60	120
Agua destilada	54.4	2.28	81.6	163.2
Total	100%	5	150	300

Ahora bien, dentro de una cabina de bioseguridad de la Universidad Icesi se prepararon los lotes de la formulación de la siguiente manera:

1. En un vaso de precipitado con el agua, adicionar lentamente el té verde utilizando ultraturrax a 5000rpm durante 15 minutos.
2. Adicionar la fructosa poco a poco hasta homogenización a 5000rpm durante 15 minutos
3. Adicionar la C.M.C y el benzoato de sodio
4. Agitar con ultraturrax por aproximadamente 15 minutos más para asegurar la integración de todos los ingredientes.
5. Envasar colocando en cada uno de los recipientes 5g de la preparación final.
6. Rotular los frascos con las etiquetas correspondientes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Tipo de solvente y tamaño de partícula para la extracción de té verde

Inicialmente, fue necesario realizar extracciones de té verde con diferentes tamaños de partícula (Figura 2) y dos tipos de solventes: agua y etanol. Esto se realizó a escala laboratorio utilizando 1g de hojas de té. Así pues, los resultados de peso y rendimiento obtenidos se presentan en la Tabla 7.

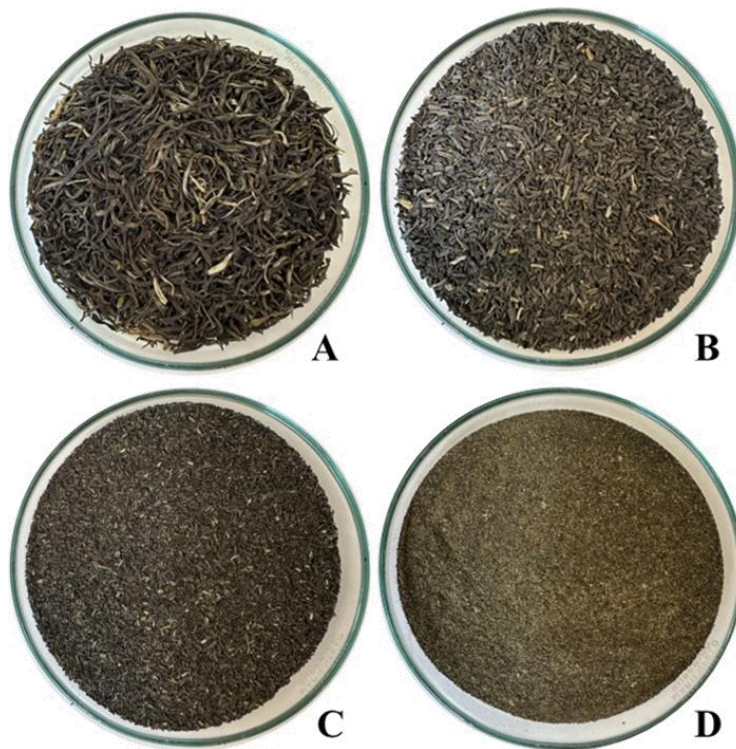
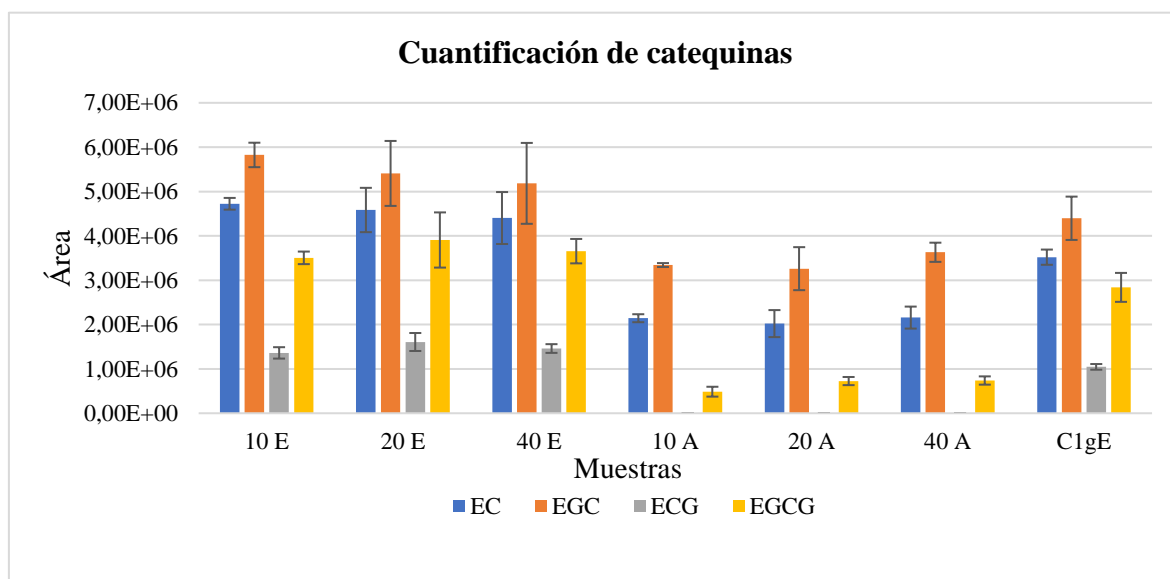


Figura 2. Té verde con diferentes tamaños de partícula: sin moler (A); tamizado malla #10 (B), #20 (C) y #40 (D).

Tabla 7. Rendimiento en peso de extracciones de té verde con diferente tamaño de partícula usando agua y etanol.

Tamaño de malla	Solvente	Rendimiento (%)
Malla #10	Agua	3.68
	Etanol	7.06
Malla #20	Agua	9.68
	Etanol	10.2
Malla #40	Agua	7.52
	Etanol	21.3
Material sin moler	Etanol	6.94

Por otro lado, se puede apreciar en la Gráfica 1 que el té verde tamizado por malla #20 (840 μ m) presenta mayor cantidad de EGCG y por malla #40 (425 μ m) presenta una cantidad menor; lo que puede indicar que disminuir de más el tamaño de partícula no garantiza una mayor cantidad de EGCG. Así mismo, el té verde sin moler y el tamizado por malla #10 (1680 μ m) presentan las respuestas más bajas, de lo cual se infiere que tener un tamaño de partícula elevado tiene una influencia negativa sobre la cantidad extraída de EGCG.



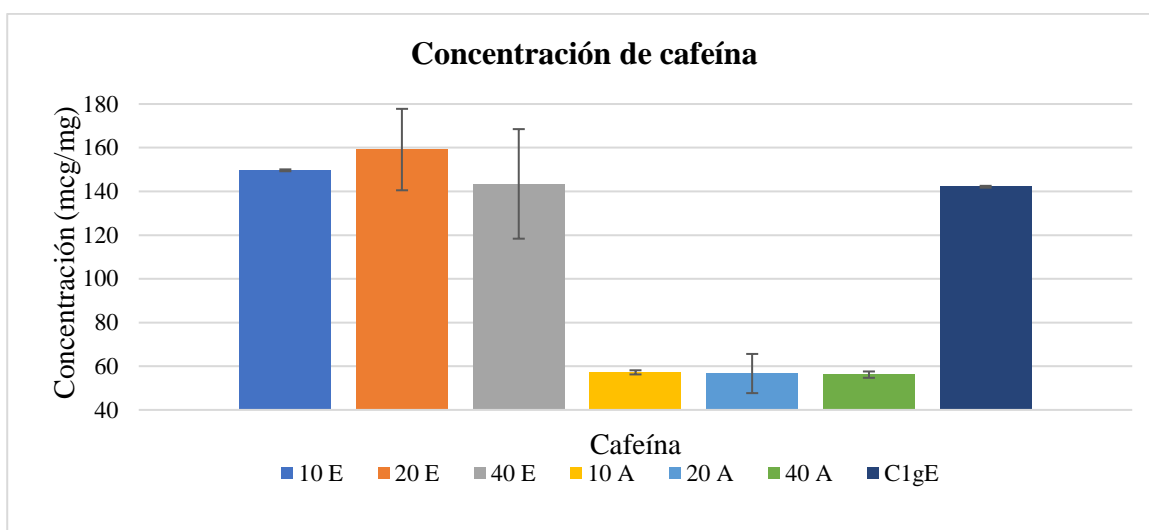
Gráfica 1. Áreas de catequinas de las muestras de té verde con su respectiva desviación estándar: 10E (malla #10; etanol), 20E (malla #20; etanol), 40E (malla #40; etanol), 10A (malla #10; agua), 20A (malla #20; agua), 40A (malla #40; agua) y C1gE (té verde sin moler; etanol).

Este comportamiento se puede evidenciar en estudios similares¹², donde al evaluar distintas extracciones de té verde con tamaños de partícula diferentes, se llegó a la conclusión de que los tamaños entre 500 – 740 μ m, presentaban un mayor porcentaje de polifenoles. Además,

excederse de 740 μ m implica extracciones con bajo porcentaje de polifenoles, pues el solvente estaría en contacto con las partes más duras de las hojas; de otro modo, estar por debajo de 500 μ m supone tener partículas muy finas que se pueden aglomerar y reducir el transporte de moléculas hacia el solvente. Por lo tanto, en cualquiera de los dos casos se observa una disminución de la extracción de polifenoles⁷.

Sin embargo, según se observa en los resultados preliminares (Gráfica 1), se consideró que el material sin moler no presentó una diferencia sumamente relevante o, al menos, no lo suficiente para realizar el proceso de molienda y tamizado, que suponían un costo y tiempo adicional para el proyecto.

Por otro lado, la cafeína tiene efectos positivos y negativos sobre la salud de las personas. Pues, es psicoestimulante debido a que favorece la síntesis de noradrenalina; además, se ha demostrado que produce un aumento del rendimiento cognitivo. Por otra parte, un consumo elevado puede provocar efectos como el nerviosismo, ansiedad o arritmias¹³.



Gráfica 2. Concentraciones en mg/g de cafeína de las muestras de té verde con su respectiva desviación estándar: 10E (malla #10; etanol), 20E (malla #20; etanol), 40E (malla #40; etanol), 10A (malla #10; agua), 20A (malla #20; agua), 40A (malla #40; agua) y C1gE (té verde sin moler; etanol).

En la Gráfica 2 se puede evidenciar que las extracciones realizadas con etanol presentan mayor contenido de cafeína, siendo la muestra tamizada por malla #20 la de respuesta más alta. Esto puede indicar que el comportamiento de la extracción de cafeína se asemeja al de EGCG (Gráfica 1), por lo tanto, el té verde sin moler tiene un contenido más bajo. Además,

para el caso de las extracciones con agua, se puede observar que su contenido de cafeína es casi la mitad de lo obtenido con las muestras de etanol.

Algunos estudios también relacionan los altos contenidos de cafeína con el uso de solventes orgánicos como el etanol¹⁴. De esta manera, se ha logrado evidenciar que las extracciones de té verde con etanol al 50% traen consigo mayor contenido de cafeína respecto al uso de solventes como el agua y el etanol a mayor concentración. Esto se puede explicar debido a la solubilidad de esta molécula en dichos solventes, pues en etanol al 50% presenta una solubilidad de 8g/100g, mientras que en agua es de 2g/100g.

Así pues, realizar la extracción realizada con etanol supone una concentración de cafeína de aproximadamente 142mg/g de té verde. Sin embargo, se debe considerar que el té verde estará en una concentración de 5% en su formulación final y que su presentación es tipo enjuague bucal, lo que indica que no habrá un consumo directo de la preparación magistral.

5.2. Escalonamiento de la extracción de té verde

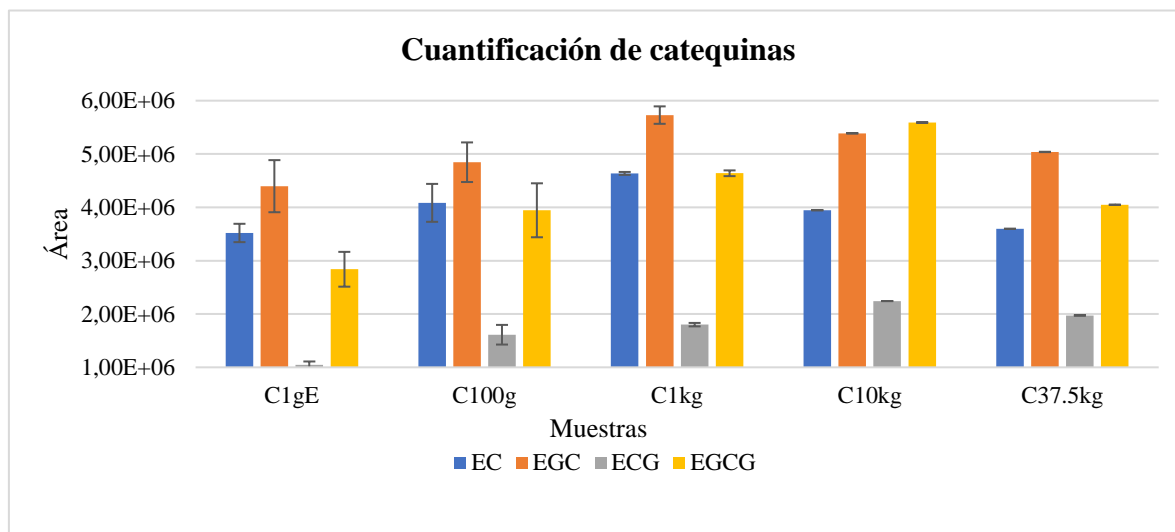
La extracción programada para este proyecto fue de aproximadamente 47kg de hojas de té verde, por lo cual, se debió hacer un proceso de escalonamiento para garantizar el contenido de catequinas en la extracción final. De este modo, los pesos y rendimientos obtenidos del polvo seco de té se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimiento en peso de extracciones de té verde usando diferentes cantidades de material vegetal.

Cantidad de té verde en la extracción	Rendimiento (%)
1g	6.94
100g	13.9
1kg	20.7
10kg	7.15
37.5kg	7.80

Ahora bien, de acuerdo con la Tabla 8 se puede determinar que las extracciones mantienen un porcentaje de rendimiento similar, a excepción de la extracción realizada de 1kg. Sin embargo, las últimas dos son las que tienen mayor interés en este estudio, debido a que fueron las extracciones que se realizaron a mayor escala y las que se usaron en la de la formulación magistral posteriormente. Esto último también se puede apreciar en la Gráfica 3, pues las proporciones de todas las catequinas se mantienen, siendo las mayoritarias EGCG y EGC,

siguiendo la EC y por último la ECG. En definitiva, se puede inferir que se garantizaron los contenidos de las catequinas en las dos últimas extracciones.



Gráfica 3. Áreas de las muestras de té verde: C1gE (1g de té), C100g (100g de té), C1kg (1kg de té), C10kg (10kg de té) y C37.5kg (37.5kg de té).

Por último, se realizó la cuantificación de las moléculas EGCG y cafeína en el té verde total (47.5kg), con el fin de determinar la concentración de ambas moléculas en el polvo liofilizado (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración en mg/g de EGCG y cafeína de la extracción total de té verde liofilizado con su respectiva desviación estándar

Molécula	Concentración (mg/g)	Desviación Estándar
EGCG	1.5803	1.1454
Cafeína	82.313	2.8506

La cuantificación final de la extracción de té verde permite evidenciar que la concentración de EGCG obtenida está por debajo de algunos estudios con condiciones similares. Por ejemplo, en el artículo de Choung et al.¹⁵ se obtuvo un rendimiento de 62.25mg/g de EGCG en la extracción realizada a 40°C por 60min. En otro estudio se logró una concentración de 74.3mg/g usando una temperatura de 45°C durante 1h¹⁶. Sin embargo, en ambos estudios se usó la extracción asistida por ultrasonido, que garantiza una optimización del rendimiento de polifenoles a una menor temperatura y tiempo de extracción¹⁷.

Por otro lado, se destacan dos factores muy importantes: la relación masa/solvente y el porcentaje de etanol. En primer lugar, para los estudios mencionados se usó una relación de 1:100 y 1:25, respectivamente. Lo anterior permite inferir que si se usa una mayor cantidad de solvente, los rendimientos de EGCG son proporcionales, por lo que si se compara con la relación usada para el presente estudio (1:3) es de esperarse que los contenidos sean más bajos.

En segundo lugar, el porcentaje de pureza del etanol para cada extracción fue de 40%, lo que difiere de la concentración usada para este proyecto (96%). Esta diferencia permite explicar el bajo rendimiento de EGCG, pues se ha evidenciado que las extracciones que se realizan con etanol 40 – 50% son más efectivas. En este sentido, la concentración de EGCG aumenta cuando se incrementa la pureza del etanol, pero, cuando sobrepasa el 50%, su eficiencia disminuye. Por ejemplo, Hu et al.¹⁸ realizaron varias extracciones (1:50) en diferentes porcentajes de etanol y se reportó un contenido de EGCG de 65 y 1.80 mg/g para las purezas 50 y 100% del solvente.

Por último, la concentración obtenida de cafeína está por encima de los valores reportados en las extracciones antes señaladas, por ejemplo, se presenta un contenido de 0.88mg/g usando etanol al 100% y 22.31mg/g para una pureza de 75%¹⁸. A pesar de que los valores estén elevados, se debe destacar que el contenido del alcaloide disminuyó notablemente en la extracción final si se compara con los estudios preliminares del proyecto. Del mismo modo, la cuantificación permite dar un seguimiento al contenido en el té, permitiendo realizar ajustes necesarios para su aplicación en formulaciones.

5.3. Estudio de degradación forzada de la formulación magistral

En la fabricación de los lotes, el té no se pudo solubilizar adecuadamente (Figura 3A), por lo que una vez pasado el tiempo del estudio y proceder con la cuantificación, fue necesario realizar un proceso de centrifugación de las muestras para retirar las partículas no solubilizadas (Figura 3B).

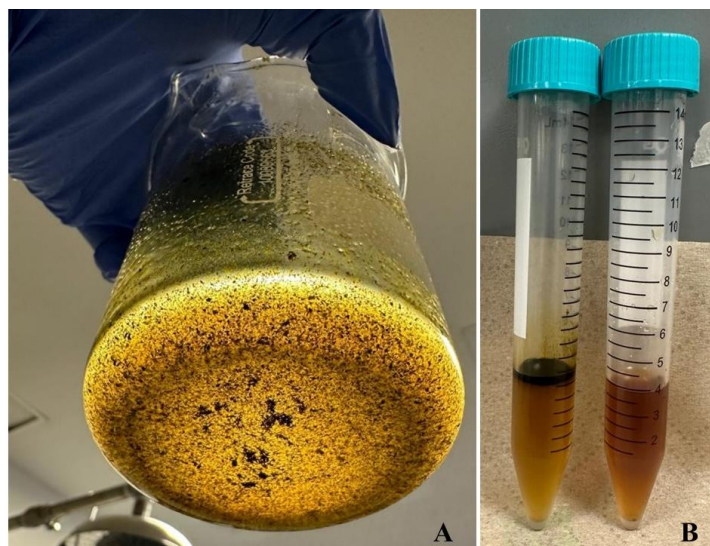
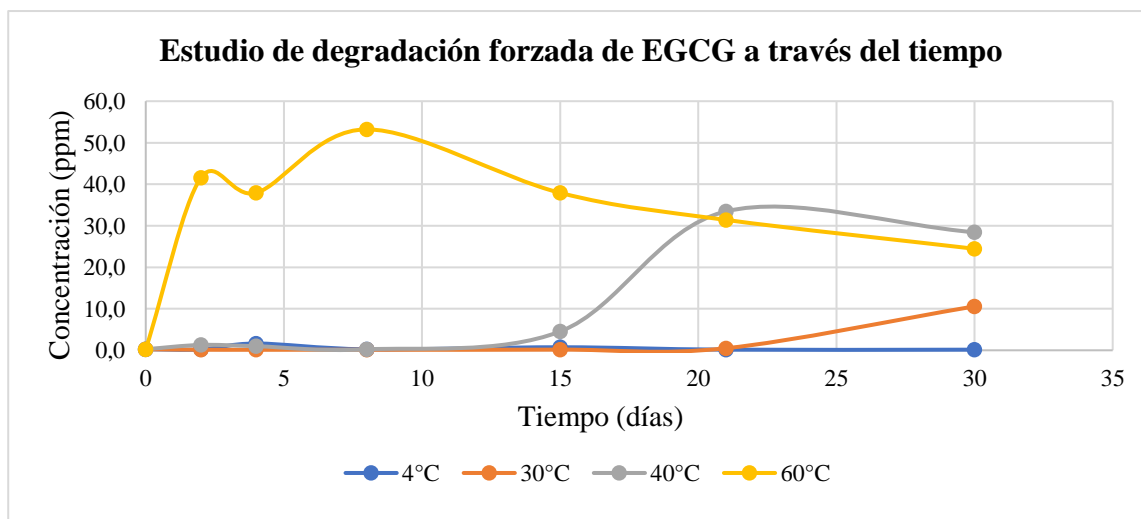


Figura 3. Incorporación del polvo de té verde en la formulación magistral: Preparación inicial de lotes para el estudio (A); centrifugación de muestras y extracción de material no solubilizado (B).

Al observar la Gráfica 4, se puede determinar que la cinética de degradación forzada no se logró de manera satisfactoria, pues las temperaturas donde se debería evidenciar una degradación de EGCG, reportan lo contrario; es decir, un aumento en la concentración de la molécula. Lo anterior puede explicarse por algunos factores físicos de la formulación magistral como la solubilidad y la viscosidad (Figura 3A), pues en las temperaturas altas (30, 40 y 60°C) hubo un aumento de la concentración después de un tiempo y en la temperatura de refrigeración (4°C) no hubo cambios significativos en la concentración, lo que podría reflejar que a esta temperatura logra ser lo suficientemente estable.

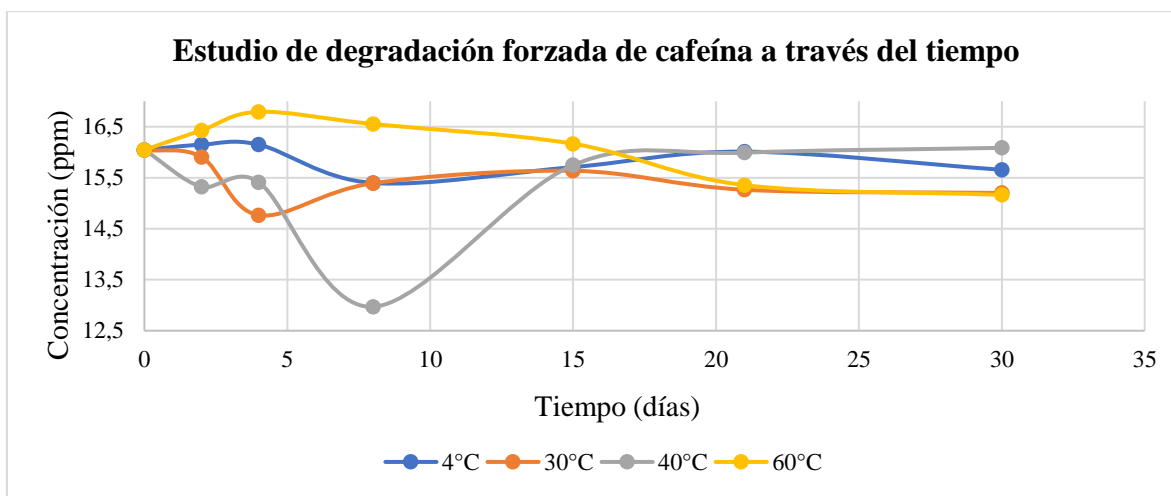


Gráfica 4. Concentraciones en ppm obtenidas de EGCG del estudio de degradación forzada a distintas temperaturas a través del tiempo.

Teniendo en cuenta que al aumentar la temperatura se incrementa la solubilidad de algunos compuestos y, así mismo, disminuye la viscosidad¹⁹, el té verde que no se incorporó correctamente durante la fabricación de la formulación magistral, pudo haberse solubilizado a temperaturas altas. Por consiguiente, el tiempo que se tardó en solubilizar el té dependió de la temperatura, dando como resultado una relación inversa entre ambas variables. Por ejemplo, a 60°C se logra observar un aumento de la concentración de EGCG al tiempo 2, mientras que este incremento se presenta en los tiempos 15 y 21 para las temperaturas 40°C y 30°C, respectivamente.

Por otro lado, las concentraciones de cafeína consignadas en la Gráfica 5 no demuestran lo mismo que las catequinas a lo largo del estudio de degradación forzada. Se logra observar fluctuaciones en las concentraciones en los primeros tiempos (T0 – T15), las cuales pudieron deberse nuevamente por las dificultades que se encontraron en la formulación magistral. Sin embargo, se podría decir que las concentraciones se mantienen relativamente constantes a través del tiempo en todas las temperaturas, o por lo menos, que las concentraciones iniciales no poseen cambios significativos con respecto a las finales.

Además, al comparar la Gráfica 4 y 5, se logra determinar que la cafeína es una molécula mucho más estable al exponerse a altas temperaturas que la EGCG. Así pues, algunos estudios lograron evidenciar que la catequina se degrada rápidamente si se expone a una temperatura de 80°C a comparación del alcaloide en té verde seco almacenado; pues en un mes, la EGCG redujo su concentración 1.3mg/g aproximadamente, y la cafeína 0.23mg/g²⁰. De esta manera, incluso se ha logrado determinar que la degradación significativa de la cafeína se observa a partir de 146°C²¹.



Gráfica 5. Concentraciones en ppm obtenidas de cafeína del estudio de degradación forzada a distintas temperaturas a través del tiempo.

De este modo, se puede inferir que el estudio presentó datos incoherentes que impiden establecer una conclusión sobre la degradación la EGCG y cafeína en la formulación. De la misma manera, si se enfatiza en el procedimiento de preparación de la fórmula magistral, se puede identificar inconsistencias en el protocolo que justifican la solubilización deficiente del té verde.

En primer lugar, en la Tabla 3 se establece que casi la mitad de la preparación es sacarosa, por lo que, si bien tiene una buena solubilidad en agua, puede generar una solución viscosa que impida la incorporación adecuada de más material, debido a que la viscosidad reduce la tasa de solubilidad. Por lo tanto, al tener una solución concentrada de sacarosa, resulta más difícil disolver otro componente²². En segundo lugar, el orden de preparación de la formulación no es el ideal, pues se podría haber establecido de forma diferente, en donde primero se garantice la homogeneidad del té verde, para luego adicionar la sacarosa.

En tercer lugar, factores como tamaño de partícula, agitación y temperatura no fueron tenidos en cuenta para asegurar la solubilización del té. En este sentido, después de la liofilización, el material vegetal resultó muy voluminoso y con alto tamaño de partícula (Figura 4A), lo que disminuyó su homogeneidad en la solución; por lo que se podría aumentar el área de superficie mediante la maceración o molienda del té verde (Figura 4B). Además, usar métodos de mezclado más eficientes que la agitación manual genera un aumento en la tasa de solubilidad e impide que se formen aglomeraciones entre las partículas. Por último, un aumento de la temperatura a la hora de preparación produce un efecto positivo en la

solubilidad, sobre todo, en soluciones viscosas, pues la viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura¹⁹.

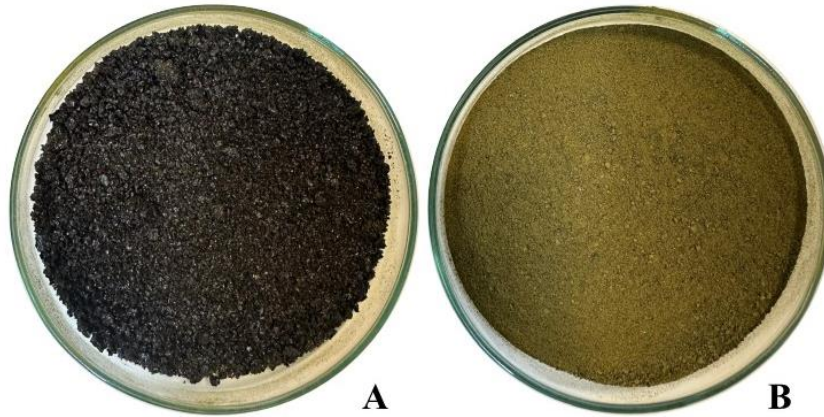


Figura 4. Té verde liofilizado (A) y macerado (B).

5.4. Estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la formulación magistral

Teniendo en cuenta los resultados del estudio anterior y las posibles fallas, se decidió corregir la preparación de la formulación y realizar un ensayo de degradación a menor tiempo. Para este caso, se logró una mejor solubilización del té verde en la preparación (Figura 5A). De este modo, se puede destacar que los factores que favorecieron este resultado fue usar el té con menor tamaño de partícula (Figura 4B), un equipo de mezclado de alta cizalla, cambiar el orden de preparación asegurando la homogeneización del té antes de agregar los demás componentes y, por último, usar fructosa en lugar de sacarosa.

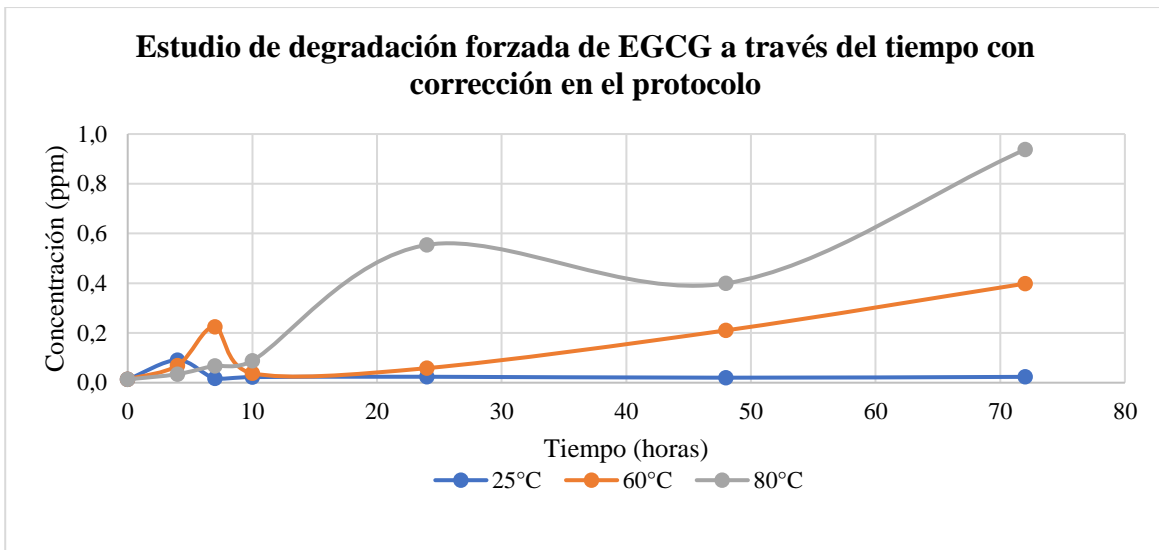
El cambio de edulcorante permitió una mejor solubilización de este, pues la solubilidad de la fructosa es de 3.75g/g y la sacarosa es de 2.04g/g en agua. De esta manera, se puede evidenciar que la fructosa puede disolverse en menor cantidad de agua, lo que a su vez favorece la reología de la formulación. Esto teniendo en cuenta que la viscosidad de la fructosa es menor a comparación con la sacarosa a una temperatura de 25°C y a una concentración de 40%p/p, pues sus valores son de aproximadamente 4.17mPa·s y 5.17mPa·s, respectivamente²³. Por lo cual, los componentes de la formulación se integraron de una mejor manera que la preparación de la Figura 3.



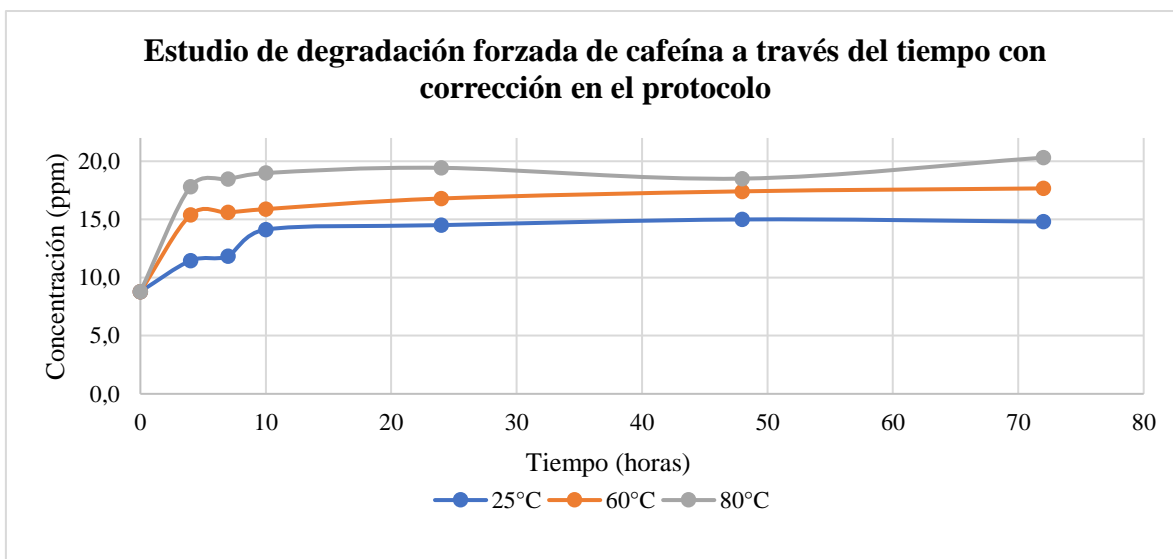
Figura 5. Incorporación del té verde en la formulación magistral corregida: Preparación inicial de lotes para el estudio (A); muestras al final del estudio (B).

Sin embargo, al final del estudio se logró observar un proceso de cremado o *creaming* (Figura 5B) que, cabe resaltar, no fue producto de centrifugación como en la Figura 3B. Así pues, el *creaming* se genera por el ascenso de gotas menos densas hacia la parte superior de una fase continua (más densa) y normalmente se presenta en emulsiones²⁴. A pesar de esto, dicha observación puede sugerir que en el té verde se encuentran compuestos apolares que resultaron de la extracción con etanol y, al no mezclarse en su totalidad con el resto de los componentes de la formulación, por efecto de la gravedad migraron hacia la parte superior de los tubos.

Ahora bien, como se logra observar en la Gráfica 6, a medida que aumentaba el tiempo, aumentaban las concentraciones de EGCG en las temperaturas 60 y 80°C, siendo para estas el incremento en T24 y T10 respectivamente. Además en la Gráfica 7, las concentraciones de cafeína presentan una cinética estable a lo largo del estudio, teniendo así que todas las temperaturas se mantienen relativamente constantes, lo que implica nuevamente que la cafeína es una molécula más estable que la EGCG.



Gráfica 6. Concentraciones en ppm obtenidas de EGCG del estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la formulación magistral a distintas temperaturas a través del tiempo.

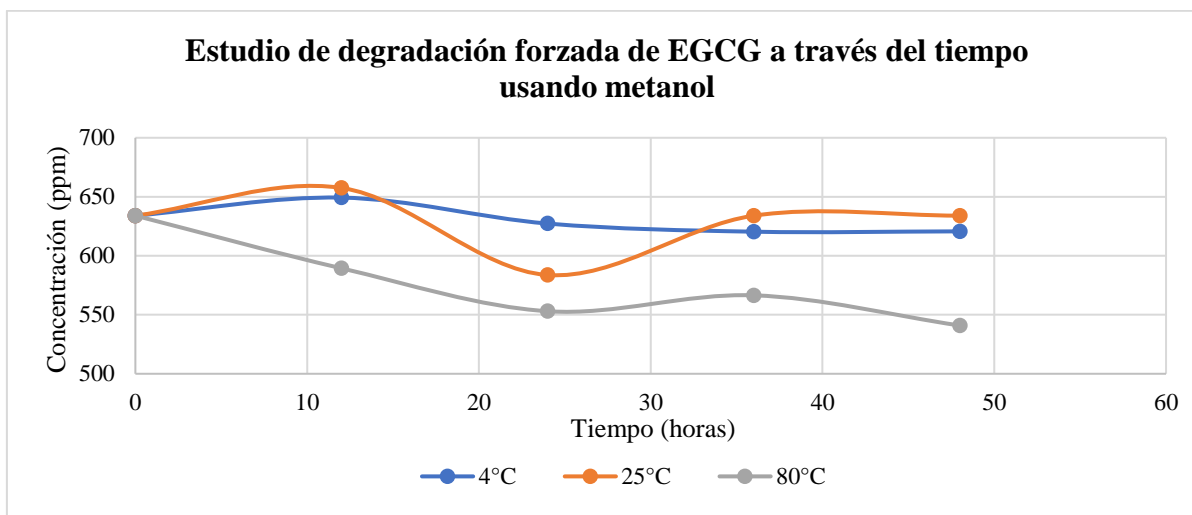


Gráfica 7. Concentraciones en ppm obtenidas de cafeína del estudio de degradación forzada con corrección en el protocolo de la formulación magistral a distintas temperaturas a través del tiempo.

Por lo tanto, los comportamientos de las gráficas anteriores también se evidencian en los resultados del primer estudio de degradación, las concentraciones de EGCG aumentan con la temperatura y el tiempo, y las de cafeína siguen presentando la misma tendencia. Lo anterior da a entender que, las modificaciones realizadas en la preparación de la formulación magistral no fueron suficientemente efectivas para garantizar la homogeneidad e

incorporación completa del té verde. Sin embargo, podría decirse que el producto en general es estable tanto a 4 como a 25°C para las moléculas de interés de este proyecto.

Finalmente, se decidió realizar un cambio en el solvente de preparación de las muestras que se inyectaron en el UPLC – MS, usando entonces metanol con el fin de contribuir en la solubilización de la formulación magistral (Gráfica 8).



Gráfica 8. Concentraciones en ppm obtenidas de EGCG del estudio de degradación forzada usando metanol como solvente de las muestras para inyectar en el UPLC – MS.

De esta forma, si se logró evidenciar una degradación durante los dos días del estudio, lo que sugiere que el metanol produce una mejor solubilización de la EGCG que el solvente usado en los otros experimentos.

6. CONCLUSIONES

Para esta investigación se logró optimizar las condiciones de extracción para el objetivo del proyecto utilizando el material sin moler y etanol al 96%, implicando así que el protocolo de extracción y secado de té verde premium arrojara valores altos, dando rendimientos en peso de alrededor de 7% con extracciones incluso de hasta 37.5kg. Además de esto, las proporciones de las moléculas estudiadas de este proyecto se conservaron a lo largo de los diferentes experimentos para obtener finalmente concentraciones de EGCG y cafeína de 1.58mg/g y 82.31mg/g, respectivamente.

Por otro lado, el estudio de degradación forzada no reflejó la cinética esperada por parte de las moléculas, debido a la baja solubilización del té verde en la formulación magistral. Del

mismo modo, a pesar de realizar modificaciones en la preparación del protocolo, no se logró obtener una degradación adecuada. Sin embargo, si se consiguió una mejor incorporación del té verde y el producto se puede considerar estable en refrigeración (4°C) y temperatura ambiente (25°C), lo cual es beneficioso para los pacientes, pues pueden almacenar el producto en condiciones fácilmente alcanzables. Finalmente, sólo se consiguieron datos válidos del estudio de degradación al corregir el solvente para preparar las muestras que se inyectan en el equipo UPLC – MS. No obstante, de lo anterior se puede concluir que se deben proponer mejoras en el protocolo de preparación que garanticen una apropiada homogeneización del té verde en las futuras formulaciones magistrales así como ajustes en la metodología de la cuantificación de sus moléculas.

7. AGRADECIMIENTOS

Daniela Osorio Vargas

Agradezco a la Universidad Icesi por brindarme los recursos necesarios para culminar mis estudios, a los profesores que estuvieron dispuestos a ofrecer su apoyo y consejo, y especialmente a nuestro tutor, por su invaluable guía, paciencia, dedicación y conocimientos compartidos durante todo el proceso.

Quiero expresar mi gratitud a mis padres y demás familiares por su amor incondicional y su apoyo constante. A mi compañera de tesis por su invaluable lealtad durante los momentos más críticos y por darme una de las amistades más sinceras que he tenido. Y a todos aquellos que contribuyeron a este proyecto, estoy eternamente agradecida.

Natalia Cerón Rojas

Agradezco a mis padres que me han dado todo lo necesario para estudiar, pues gracias a su esfuerzo, amor y dedicación he podido llegar a la última fase de mi carrera profesional.

También, agradezco a cada uno de los profesores que contribuyeron a mi crecimiento profesional y personal, especialmente, a nuestro tutor que siempre nos brindó su apoyo y su experiencia para el desarrollo del proyecto.

Finalmente, le doy gracias a mi compañera de tesis, quien no solo hizo parte de este trabajo sino que me ofreció una de las amistades más valiosas que he podido tener durante estos años.

8. REFERENCAS BILIOGRÁFICAS

1. Kong, C., Zhang, H., Li, L. & Liu, Z. Effects of green tea extract epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on oral disease-associated microbes: a review. *J Oral Microbiol* **14**, (2022).
2. Musial, C., Kuban-Jankowska, A. & Gorska-Ponikowska, M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
3. Pasrija, D. & Anandharamakrishnan, C. Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food Bioproc Tech* **8**, 935–950 (2015).
4. Castelló Gómez, M., Fito Suñer, P., Seguí Gil, L. & Betoret Valls, N. Fundamentos de La Extracción Sólido-Líquido. (2020).
5. Plaskova, A. & Mlcek, J. New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Frontiers in Nutrition* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1118761> (2023).
6. Perva-Uzunalić, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chem* **96**, 597–605 (2006).
7. Bindes, M. M. M., Cardoso, V. L., Reis, M. H. M. & Boffito, D. C. Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. *J Food Eng* **241**, 97–104 (2019).
8. Nowak, D. & Jakubczyk, E. The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods* **9**, (2020).
9. Merck. HPTLC. <https://www.merckmillipore.com/CO/es/analytics-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/hptlc/NGub.qB.fCoAAAFVPmJDx07N,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>.
10. Measurlabs. UPLC-MS Analysis | Ultra-Performance Liquid Chromatography. <https://measurlabs.com/methods/uplc-ms-analysis/>.

11. Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K. & Conway, D. I. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J* **233**, 780–786 (2022).
12. Majeed, H. & Gupta, V. Adverse Effects of Radiation Therapy. *StatPearls* (2023).
13. Gramza-Michałowska, A. Caffeine in tea *Camellia sinensis* — Content, absorption, benefits and risks of consumption. *J Nutr Health Aging* **18**, 143–149 (2014).
14. Ci-Jie, H. et al. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. *Food Chem* **194**, 312–318 (2016).
15. Choung, M. G. et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. *Int J Food Sci Technol* **49**, 1572–1578 (2014).
16. Saklar Ayyildiz, S. et al. Optimizing the extraction parameters of epigallocatechin gallate using conventional hot water and ultrasound assisted methods from green tea. *Food and Bioproducts Processing* **111**, 37–44 (2018).
17. Kumar, K., Srivastav, S. & Sharanagat, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, (2021).
18. Hu, C. J. et al. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. *Food Chem* **194**, 312–318 (2016).
19. Chang, R. & Goldsby, K. *Química*. (2013).
20. Kim, J. M. et al. Effect of storage temperature on the antioxidant activity and catechins stability of Matcha (*Camellia sinensis*). *Food Sci Biotechnol* **29**, 1261–1271 (2020).
21. Grzelczyk, J., Fiurasek, P., Kakkar, A. & Budryn, G. Evaluation of the thermal stability of bioactive compounds in coffee beans and their fractions modified in the roasting process. *Food Chem* **387**, (2022).
22. Braun, R. J. & Parrott, E. L. Influence of Viscosity and Solubilization on Dissolution Rate. *J Pharm Sci* **61**, 175–178 (1972).
23. Telis, V. R. N., Telis Romero, J., Mazzotti, H. B. & Gabas, A. L. Viscosity of aqueous carbohydrate solutions at different temperatures and concentrations. *Int J Food Prop* **10**, 185–195 (2007).

24. Wilde, P. J. Improving Emulsion Stability Through Selection of Emulsifiers and Stabilizers. *Food Science* **1**, 1–9 (2019).