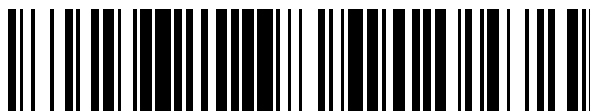


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 731**

51 Int. Cl.:

**A23F 5/46** (2006.01)

**A23F 5/50** (2006.01)

**A23L 1/22** (2006.01)

**A23L 1/234** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06773633 .0**

96 Fecha de presentación: **20.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1893034**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **Procedimientos para aislar compuestos amargos para la utilización en productos alimenticios y para beber**

30 Prioridad:  
**20.06.2005 US 156883**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.08.2012**

73 Titular/es:  
**The Folger Coffee Company  
One Strawberry Lane  
Orrville, Ohio 44667, US**

72 Inventor/es:  
**ZEHENTBAUER, Gerhard, Norbert;  
BUNKE, Paul, Ralph;  
EKANAYAKE, Athula;  
YOUNG, Jerry, Douglas;  
FRANK, Oliver;  
HOFMANN, Thomas, Frank y  
BLUMBERG, Simone**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 386 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para aislar compuestos amargos para la utilización en productos alimenticios y para beber.

5 **Campo de la invención**

Las formas de realización de la presente invención se refieren de manera general a procedimientos para aislar compuestos amargos para la utilización en productos alimenticios y para beber para mejorar los sabores de los mismos.

10

**Antecedentes de la invención**

Aparte de su efecto estimulante, la popularidad de las bebidas de café recién preparado se debe en gran parte al disfrute del consumidor de su seductor aroma, así como el atractivo y bien equilibrado perfil de sabor, que se caracteriza por un amargor único y específico del café. En general, en el caso de que se encuentren presentes a niveles bajos, los componentes responsables del amargo pueden ayudar a reducir la acidez del café proporcionando simultáneamente cuerpo y volumen. Sin embargo, en el caso de que la concentración de los componentes amargos se reduzca en exceso, el frágil equilibrio entre aroma, acidez, amargor y astringencia se rompe, resultando de esta manera en atributos de sabor menos deseables. De manera similar, en el caso de que la concentración se incremente en exceso, los componentes de amargor pueden ocultar los demás componentes del sabor presentes en la bebida del café, nuevamente resultando en un sabor no deseable. Debido a que determinadas bebidas de café, tales como el instantáneo y el descafeinado, tienden a presentar concentraciones mucho menores de componentes amargos, estas bebidas con frecuencia se caracterizan por presentar un sabor débil y desagradable para el consumidor.

25

En efecto, actualmente se dispone de muy poca información sobre la estructura de los componentes que proporcionan este apreciable amargor. Mucha de la información disponible tiende a centrarse en métodos para eliminar componentes, tales como la cafeína, de los productos de café intensamente amargos con el fin de proporcionar bebidas de café más equilibradas que resulten atractivas para una base más amplia de consumidores. El documento GB nº 2.089.639 divulga un procedimiento para aislar volátiles de aroma de un extracto acuoso de café en el que dicho extracto se somete a concentración mediante evaporación; los vapores se condensan a continuación para formar un líquido acuoso y dicho líquido se pasa a través de un adsorbente con el fin de adsorber los volátiles aromáticos. El documento JP nº 02-005825 divulga un método de producción de una sustancia amarga natural que comprende tratar el extracto del café tostado con un adsorbente de resina porosa sintética basada en estireno-divinilbenceno o en éster de metacrilato y recoger el componente adsorbido.

30

35

En el caso de que se desarrollasen procedimientos para identificar y aislar componentes amargos de una manera consistente con la calidad alimentaria, se cree que el componente podría utilizarse para suplementar y mejorar el sabor de los productos alimenticios y para beber en una diversidad de maneras no consideradas anteriormente. Dichos procedimientos podrían reducir simultáneamente el malgasto de estos componentes amargos, proporcionando simultáneamente una manera para mejorar el sabor, cuerpo y carácter de otros productos alimenticios y para beber, tal como se describe en la presente memoria.

40

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de procedimientos para aislar compuestos amargos, de manera que puedan añadirse los compuestos amargos a los productos alimenticios y para beber para mejorar el sabor de los mismos.

45

**Sumario de la invención**

En una forma de realización, la presente invención se refiere a procedimientos para aislar compuestos amargos para la utilización en productos alimenticios y para beber, que comprende poner en contacto una composición de compuesto amargo con un adsorbente con el fin de adsorber los compuestos amargos de la composición de compuesto amargo, desorber los compuestos amargos del adsorbente con el fin de obtener un aislado de compuesto amargo y añadir el aislado de compuesto amargo a un producto alimenticio o para beber para mejorar el sabor del mismo.

50

55

En todavía otra forma de realización, la presente invención se refiere a aislados de compuestos amargo para mejorar el sabor de productos alimenticios y para beber, comprendiendo el aislado de compuesto amargo por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por 3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 5-O-cafeoil- $\epsilon$ -quinida, 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-dicafeoil- $\epsilon$ -quinida, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil- $\epsilon$ -quinida, 3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-diferuloil- $\epsilon$ -quinida, 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinida, quinida esterificada con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, cis-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán y mezclas de los mismos.

60

65

**Descripción detallada de la invención**I. Definiciones

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "adsorbente" se refiere a un material de calidad alimentaria que puede adsorber quinidas y/o fenilindanos amargos a partir de una composición de compuesto amargo, seleccionado de entre polímeros naturales o sintéticos que contienen grupos amida y combinaciones de los mismos. Dicho adsorbente comprende de manera no limitativa, poliamida, polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona, caseína, zeína y combinaciones de los mismos.
- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "compuesto o compuestos amargos" se refiere a quinidas amargas, fenilindanos amargos y mezclas de los mismos, tal como se define a continuación en la presente memoria.
- 15 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "quinida o quinidas amargas" o "quinida o quinidas" se utilizan para describir de manera general cualquier quinida amarga, incluyendo las del aislado de compuesto amargo, derivado a partir del tueste del ácido clorogénico.
- 20 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "fenilindano o fenilindanos amargos" o "fenilindano o fenilindanos" se utilizan para describir de manera general cualquier fenilindano amargo, incluyendo los del aislado de compuesto amargo, derivado a partir del tueste de ácido clorogénico o ácido cafeico.
- 25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "aislado de compuesto amargo" se utiliza para referirse a los compuestos obtenidos mediante los presentes procedimientos con independencia del método por el que se obtienen y generalmente puede incluir quinidas amargas, fenilindanos amargos y mezclas de los mismos. Al utilizarse para mejorar el sabor de un producto alimenticio o para beber, el aislado de compuesto amargo no incluye ningún compuesto amargo natural que puede encontrarse presente en el producto alimenticio o para beber que se mejore.
- 30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición de compuesto amargo" se refiere a un sólido o líquido que comprende por lo menos uno de entre las quinidas amargas, los fenilindanos y las mezclas de los mismos para la utilización en los procedimientos descritos en la presente memoria. La composición de compuesto amargo puede comprender por lo menos un ácido clorogénico y/o ácido cafeico tostado derivado a partir de fuentes de ácido natural o sintético. A título ilustrativo, la composición de compuesto amargo puede comprender infusión de
- 35 café o extracto de café.
- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ácido o ácidos clorogénicos" se refiere a cualquier ácido libre derivado a partir de fuentes de ácido natural o sintético seleccionado de entre el grupo constituido por ácidos quínicos monocateoilo, ácidos quínicos dicafeoilo, ácidos quínicos tricafeoilo, ácidos quínicos monoferuloilo, ácidos quínicos diferuloilo, ácidos quínicos triferuloilo, ácido quínico esterificado con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico y ácido 3,4-dimetoxicinámico. Los ácidos clorogénicos, derivados a partir de fuentes naturales o sintéticamente, pueden formar quinidas amargas al tostarse tal como se describe en la presente memoria.
- 45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" diversos componentes puede utilizarse conjuntamente en los métodos y artículos de la presente invención. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las expresiones "constituido/a esencialmente por" y "constituido/a por" se encuentran comprendidas en la expresión "que comprende".
- 50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "calidad alimentaria" se refiere a que el material puede utilizarse legalmente como parte de las operaciones unitarias de un procedimiento alimentario o que el contacto con un alimento ha sido autorizado por las autoridades reguladoras. La expresión "manera consistente con la calidad alimentaria" se refiere a utilizar un material de manera que satisfaga las normas reguladoras anteriormente indicadas.
- 55 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fuente de ácido natural" se refiere a un material vegetal que comprende ácido clorogénico y/o ácido cafeico. La expresión "fuente de ácido natural" comprende de manera no limitativa, granos de café, bayas de café maduras, hojas de boniato, patatas, manzanas, piñas, cerezas, melocotones y combinaciones de los mismos.
- 60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición residual de compuesto amargo" se refiere a los componentes de la composición de compuesto amargo que no resultan adsorbidas por el adsorbente o extraídas por el solvente.
- 65 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tueste" se refiere al procedimiento de calentamiento de cualquiera de los ácidos o fuentes de ácido anteriormente indicados, naturales o sintéticos, bajo las mismas

condiciones generales que las utilizadas al tostar granos de café verde. El tueste puede llevarse a cabo a presión ambiente o elevada y la temperatura de tueste puede ser constante o seguir una curva deseada (por ejemplo una rampa). Los ácidos o fuentes de ácido pueden tostarse independientemente o pueden mezclarse con un material inerte, tal como, por ejemplo, celulosa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "solvente" se refiere a cualquier solvente de calidad alimentaria, que comprende de manera no limitativa, agua, etanol, acetona, acetato de etilo y mezclas de los mismos. Al utilizarse en la etapa de desorción indicada en la presente memoria, el solvente puede incluir además cualquier solvente capaz de eliminar las quinidas y/o fenilindanos amargos de un adsorbente. Al utilizarse en la etapa de extracción indicada en la presente memoria, el solvente puede incluir además cualquier solvente capaz de eliminar las quinidas y/o fenilindanos amargos de una composición.

## II. Compuestos amargos

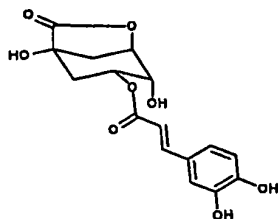
Las formas de realización de la presente invención proporcionan de manera general unos procedimientos para aislar compuestos amargos, entre ellos quinidas y fenilindanos, para la utilización en productos alimenticios y para beber. Aunque la exposición a continuación se refiere generalmente a la identificación, el aislamiento y la utilización de dichos compuestos amargos en bebidas de café, el experto en la materia apreciará que esta utilización del café se proporciona únicamente a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Se ha determinado que los componentes mencionados anteriormente pueden incluir quinidas amargas y puede comprender generalmente monocateoil-quinidas y dicafeoil-quinidas amargas, cafeoil-feruloil-quinidas y monoferuloil-quinidas y diferuloil-quinidas. Las quinidas amargas pueden obtenerse a partir de ácido clorogénico tostado, o más concretamente, ácidos monocateoil-quinico, dicafeoil-quinico o tricafeoil-quinico, ácidos monoferuloil-quinico, diferuloil-quinico o triferuloil-quinico, o los ácidos quinicos correspondientes que contienen residuos cafeoil y feruloil, que han sido tostados bajo condiciones controladas para formar quinidas tras la eliminación del agua intramolecular, así como la transesterificación intermolecular. El perfil de sabor amargo de dichas quinidas es único en comparación con otros saborizantes amargos y ácidos conocidos presentes en el café, tales como la cafeína, la L-fenilalanina y las 2,5-dicetopiperazinas, así como los ácidos quinico y fosfórico.

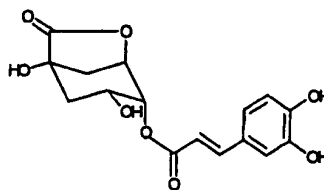
En general, las quinidas amargas presentan un claro amargor "limpio" y astringencia de tipo café, mientras que otros saborizantes tienden a mostrar un sabor amargo-ácido. Por ejemplo, mientras que las quinidas amargas proporcionan amargor en combinación con una ligera astringencia en el paladar, dicho amargor puede desaparecer rápidamente tras la deglución, resultando de esta manera en una percepción limpia de la amargor. En contraste, la amargor de la cafeína puede ser un amargor de tipo "alcaloide" que produce un retrogusto amargo persistente y desagradable que puede permanecer en la garganta durante un periodo de tiempo prolongado tras la deglución.

Es conocido que varias quinidas se encuentran presentes en el café tostado, entre ellas la 3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, la 4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, la 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinida y la 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida. Ver Ginz M. y Engelhardt U.H., "Analysis of Fractions of Roasted Coffee by LC-ESI-MS: New Chlorogenic Acid Derivatives", Colloque Scientifique International sur le Café, 19a edición, 248-252, 2001. Sin embargo, aunque se ha mencionado la existencia de estas quinidas, previamente al trabajo de los presentes inventores, el carácter amargo verdadero de muchos de estos compuestos, así como su base molecular, se entiende mucho menos. Además, tal como se expone a continuación en la presente memoria, en la actualidad no existe ningún procedimiento conocido para aislar las quinidas para la utilización en los productos alimenticios y para beber, ya que este uso requiere que los compuestos se preparen de una manera consistente con la calidad alimentaria. Ver Food Chemicals Codex, 5a edición, The National Academies Press, Washington D.C., 2004, páginas xxix-xxxii. Además, los presentes inventores han descubierto que la estructura química de por lo menos dos de los compuestos mencionados anteriormente podría no encontrarse descrita con exactitud en la técnica, tal como se explica posteriormente.

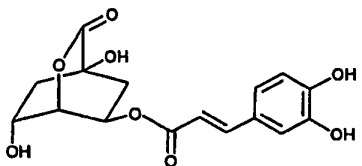
3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinidina



4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinidina

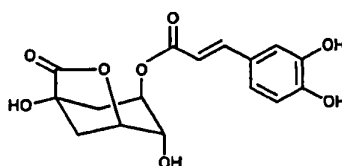


5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinidina



5 Se menciona la 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinidina en la referencia de Ginz; sin embargo, la referencia identifica el grupo hidroxilo en C-3 como situado en la posición ecuatorial, mientras que los presentes inventores han descubierto que el grupo hidroxilo en C-3 se encuentra situado, de hecho, en la posición axial (mostrada anteriormente). Eso resulta importante ya que la estereoquímica se cree que es uno de los factores clave para determinar la actividad saborizante de un compuesto.

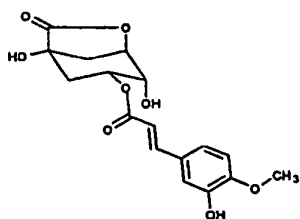
5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina



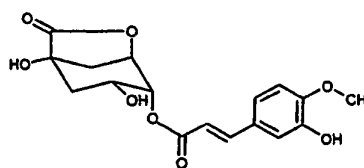
10 Nuevamente, la 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina se menciona en la referencia de Ginz; sin embargo, la referencia identifica el grupo ácido cafeico de C-5 como situado en la posición ecuatorial, mientras que los presentes inventores han descubierto que el grupo ácido cafeico de C-5 se encuentra situado, de hecho, en la posición axial (mostrada anteriormente). Nuevamente, esto es una diferencia importante, ya que la estereoquímica ayuda a determinar la actividad saborizante de un compuesto.

15 Además de las quinidas anteriormente indicadas, los presentes inventores han descubierto diversas variedades más. En particular, los presentes inventores han identificado recientemente 3-O-feruloil- $\gamma$ -quinidina, 4-O-feruloil- $\gamma$ -quinidina, 3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinidina, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina, 3,5-O-dicafeoil-epi- $\delta$ -quinidina, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinidina, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinidina y 5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinidina, 3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinidina, 3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinidina y 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinidina como quinidas amargas. Estas recién descubiertas quinidas amargas son diferentes de los compuestos amargos anteriormente descritos en el aspecto de que generalmente presentan un patrón de sustitución más complejo y su estereoquímica es diferente de la de los compuestos conocidos, que, tal como se ha indicado anteriormente, se cree que resulta importante para determinar la actividad saborizante.

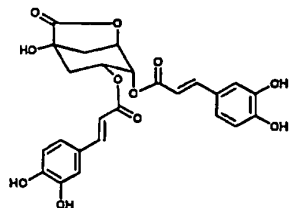
3-O-feruloil- $\gamma$ -quinidina



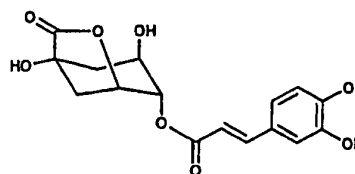
4-O-feruloil- $\gamma$ -quinidina



3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinidina

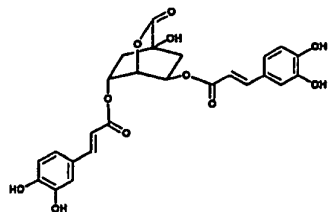


4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina

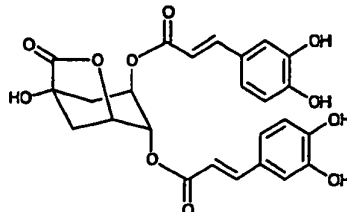


30

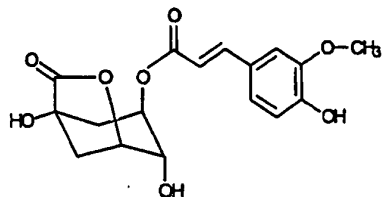
3,5-O-dicafeoil-epi- $\delta$ -quinidina



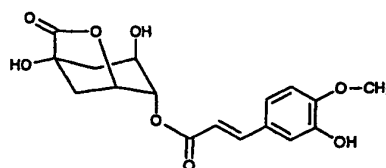
4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinidina



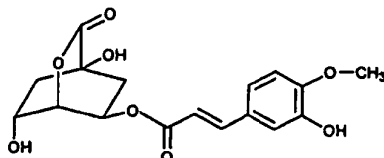
5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinidina



4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinidina

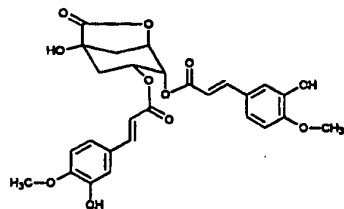


5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinidina

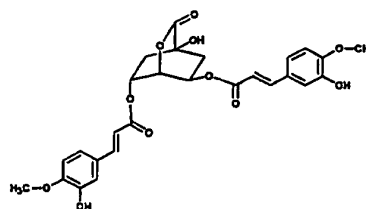


5

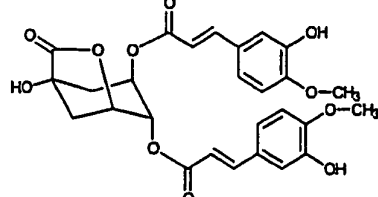
3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinidina



3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinidina



4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinidina



10

Además, los presentes inventores han descubierto inesperadamente una fracción de elución tardía de compuestos amargos todavía más complejos, que no han sido dados a conocer anteriormente. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de elución tardía" se refiere a compuestos que eluyen entre aproximadamente 50 y aproximadamente 56 minutos al utilizar el método para evaluar compuestos amargos tal como se describe en la sección de métodos analíticos de la presente memoria. Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que esta fracción amarga de elución tardía comprende numerosos ácidos quinídeos de esterificación múltiple con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico y combinaciones de los mismos. Además, el análisis de dilución del sabor tal como se encuentra descrito en la literatura (ver, por ejemplo, Ottinger H. et al., "Characterization of natural "cooling" compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis", Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(3):1336-44, 2001), así como el cálculo de los valores de actividad del sabor, indica que los compuestos que comprende esta fracción de elución tardía son los contribuyentes más importantes al sabor amargo único del café.

15

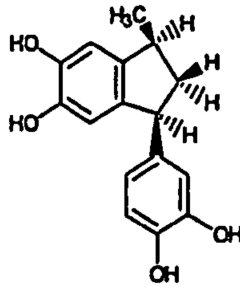
20

25

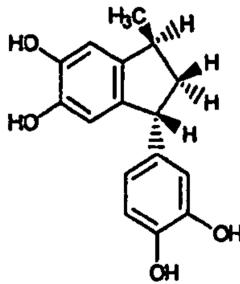
Además, los presentes inventores han identificado cuatro compuestos de sabor fuertemente amargo; sin embargo, estos compuestos no se incluyen en la clase química de las quinidas. Se ha determinado que, aunque estos dos

compuestos coeluyen con la fracción amarga de elución tardía anteriormente indicada, pertenecen a la clase química de los fenilindanos. Los fenilindanos han sido identificados anteriormente como antioxidantes generados térmicamente; sin embargo, no se ha informado del sabor amargo de estos compuestos anteriormente en la literatura. Ver Stadler R.H., Welti D.H., Staempfli A.A. y Fay L.B., "Thermal Decomposition of Caffeic Acid in Model Systems: Identification of Novel Tetraoxygenated Phenylindan Isomers and Their Stability in Aqueous Solutions", Journal of Agricultural and Food Chemistry 44:898-905, 1996; François L. Guillot, Armand Malnoë y Richard H. Stadler, "Antioxidant Properties of Novel Tetraoxygenated Phenylindan Isomers Formed during Decomposition of Caffeic Acid", Journal of Agricultural and Food Chemistry 44:2503-2510, 1996, y patente EP nº 687661 A1. En detalle, dichos cuatro compuestos pueden identificarse como:

cis-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán



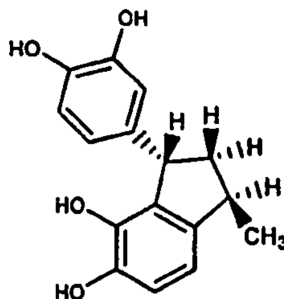
(trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán)



cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán



trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán



Estos interesantes resultados, tanto la determinación del carácter amargo de varios compuestos conocidos, como la identificación de nuevas variedades de compuestos amargos, comprenden sólo un aspecto de la presente invención.

Además, los presentes inventores también han descubierto inesperadamente que, en el caso de que se aislen correctamente, los compuestos amargos (es decir, las quinidas y/o los fenilindanos) pueden añadirse a productos alimenticios y para beber para potenciar el sabor amargo de los mismos. Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que la potenciación del sabor que resulta de la adición de dichos aislados de compuestos amargo a productos alimenticios y para beber se debe a su característico perfil amargo de tipo café tostado, que no puede ser imitado por ningún otro compuesto amargo conocido (por ejemplo la cafeína, la quinina, las 2,5-dicetopiperazinas o la L-fenilalanina), y que proporciona un sabor único específico del café.

### III. Procedimientos para aislar compuestos amargos para la utilización en productos alimenticios y para beber

Tal como se ha mencionado anteriormente, en el caso de que se aislen correctamente, los compuestos amargos pueden utilizarse para potenciar el sabor de productos alimenticios y para beber. En una forma de realización, los procedimientos en la presente memoria pueden referirse a aislar compuestos amargos seleccionados de entre mezclas de quinidas y fenilindanos para la utilización en productos alimenticios y para beber, que generalmente comprenden poner en contacto una composición de compuesto amargo con un adsorbente con el fin de adsorber los compuestos amargos de la composición de compuesto amargo, seleccionando dicho adsorbente de entre el grupo constituido por polímeros naturales que contienen grupos amida, polímeros sintéticos que contienen grupos amida y combinaciones de los mismos, desorber los compuestos amargos del adsorbente con el fin de obtener un aislado de compuesto amargo, y añadir el aislado de compuesto amargo a un producto alimenticio o para beber para mejorar el sabor del mismo.

La primera etapa del procedimiento descrito en la presente memoria implica poner en contacto una composición de compuesto amargo con un adsorbente con el fin de adsorber los compuestos amargos, que comprende por lo menos quinidas amargas, fenilindanos amargos y mezclas de los mismos. Más concretamente, la composición de compuesto amargo puede ser un sólido o un líquido y puede comprender por lo menos un ácido clorogénico tostado seleccionado de entre el grupo constituido por ácidos monocateoil-quinicos, ácidos dicafeoil-quinicos, ácidos tricafeoil-quinicos, ácidos monoferuloil-quinicos, ácidos diferuloil-quinicos, ácidos triferuloil-quinicos, ácido quínico esterificado con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, ácido cafeico y mezclas de los mismos, derivados a partir de fuentes de ácido naturales o sintéticas. La composición de compuesto amargo puede presentar generalmente un pH inferior a aproximadamente 7, y en una forma de realización, inferior a aproximadamente 6. Los presentes inventores han descubierto que a un pH superior a aproximadamente 7, el anillo quinida de cualesquiera quinidas amargas presentes puede presentar una tendencia a iniciar su apertura y a formar los ácidos correspondientes, lo que resulta en una pérdida de sabor amargo.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los ácidos tostados de la composición de compuesto amargo puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes de ácido naturales o sintéticas. Por ejemplo, en una forma de realización, los ácidos tostados pueden obtenerse a partir de una fuente de ácido natural que comprende cualquier material vegetal que comprenda ácidos clorogénicos, tales como, por ejemplo, granos de café verde, bayas de café maduras, hojas de boniato, patatas y frutas tales como manzanas, piñas, cerezas y melocotones. Estas fuentes naturales de ácido en primer lugar pueden tostarse para convertir el ácido clorogénico y/o el ácido cafeico en quinidas y/o fenilindanos amargos, que pueden extraerse a continuación utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria. Alternativamente, los ácidos clorogénicos y/o el ácido cafeico pueden extraerse de la fuente de ácido natural y después tostarse para convertir los ácidos en quinidas y/o fenilindanos amargos. Los ejemplos de composiciones de compuesto amargo derivadas de fuentes naturales de ácidos se comprenden de manera no limitativa, infusión de café o extracto de café.

La infusión de café puede comprender una mezcla de café tostado y molido de fuerza intermedia preparado a partir de entre aproximadamente 20 g y aproximadamente 60 g de café tostado y molido y entre aproximadamente 1.000 ml y aproximadamente 1.500 ml de agua. Dicha infusión de café puede producirse en una cafetera convencional, así como en cualquier otro dispositivo o aparato de preparación conocido en la técnica. El extracto de café puede obtenerse a partir de café mediante una diversidad de métodos de extracción, entre ellos, de manera no limitativa, la extracción directa mediante la utilización de solventes, tales como mezclas de etanol y agua, o mediante extracción por lotes, extracción en columna o extracción continua utilizando, por ejemplo, una unidad extractora de tipo Soxhlet. El experto en la materia conocerá cómo llevar a cabo los procedimientos de extracción anteriormente indicados. Tras obtener el extracto de café, puede purificarse y/o concentrarse previamente a la utilización como composición de compuesto amargo.

El café utilizado para preparar la infusión de café o el extracto de café puede obtenerse de cualquiera de entre varios países de origen, incluyendo, de manera no limitativa, Colombia, México, Guatemala, Brasil o combinaciones de los mismos, y puede ser descafeinado o sin experimentar reducción de cafeína. Además, la infusión de café o el extracto de café puede comprender una única variedad de café, tal como Arabica o Robusta, o puede comprender una mezcla de los mismos. Además, aunque el café utilizado para preparar la infusión de café o el extracto de café puede tostarse en cualquier grado utilizando prácticas comunes, en una forma de realización el café puede comprender tuestes ligeros a medios, debido a que los presentes inventores han descubierto que las quinidas amargas presentan una tendencia a degradarse durante el tueste prolongado.



En otra forma de realización, los ácidos tostados de la composición de compuesto amargo puede derivarse de una fuente sintética de ácido, tal como, por ejemplo, ácido clorogénico o ácido cafeico sintético.

5 El tueste de cualquiera de los ácidos o fuentes de ácido mencionados anteriormente, sean naturales o sintéticos, puede comprender el tueste bajo las mismas condiciones generales a las utilizadas al tostar los granos de café verde. El tueste puede llevarse a cabo a presión ambiente o elevada y la temperatura de tueste puede ser constante o seguir una curva deseada (por ejemplo una rampa). Sin embargo, al tostar los ácidos directamente, en lugar de tostar la fuente de ácido y extraer los ácidos tostados, debe indicarse que los ácidos pueden tostarse independientemente o pueden mezclarse con un material inerte, tal como, por ejemplo, celulosa, para modificar los  
10 productos tostados en una dirección determinada. Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que, en el caso de que los ácidos se tuesten por sí solos, la formación de la fracción de elución tardía más compleja puede resultar favorecida, mientras que en el caso de que los ácidos se mezclen con un material inerte, puede resultar favorecida la formación de monoquinidas. En cualquier caso, tras completar el tueste, el compuesto amargo resultante puede solubilizarse con un solvente para preparar la etapa siguiente, que puede comprender la adsorción o la extracción.  
15

#### i. Adsorción

Aunque puede utilizarse cualquier adsorbente capaz de adsorber los compuestos amargos, debido a que las formas de realización de la presente invención intentan producir un aislado de compuesto amargo aceptable para la utilización en productos alimenticios y para beber, en una forma de realización el adsorbente puede comprender un adsorbente de calidad alimentaria. Tal como se utiliza en la presente memoria, "calidad alimentaria" se refiere a que el material puede utilizarse legalmente como parte de las operaciones unitarias de un procedimiento alimentario o que el contacto con un alimento ha sido autorizado por las autoridades reguladoras. Entre algunos ejemplos de  
20 adsorbentes aceptables para la utilización en la presente memoria se incluyen, de manera no limitativa, poliamida, polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona, caseína, zeína y combinaciones de los mismos.  
25

Tras seleccionar el adsorbente, la composición de compuesto amargo puede ponerse en contacto con el adsorbente de una diversidad de maneras, incluyendo, de manera no limitativa, la extracción por lotes o el aislamiento en columna. Se describe cada método con mayor detalle a continuación.  
30

Al utilizar la extracción por lotes, el adsorbente puede añadirse directamente a la composición de compuesto amargo. La extracción por lotes puede llevarse a cabo a cualquier temperatura, aunque en una forma de realización, la composición de compuesto amargo puede enfriarse hasta aproximadamente la temperatura ambiente previamente a la adición del adsorbente, ya que se cree que las temperaturas más altas pueden reducir el rendimiento global de compuesto amargo. Además, el tiempo durante el que el adsorbente se mantiene en contacto con la composición de compuesto amargo es variable aunque generalmente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 15 minutos resulta tiempo suficiente para conseguir una adsorción de aproximadamente 95% de los compuestos amargos. De manera similar, la cantidad de adsorbente necesaria para una adsorción óptima del  
35 compuesto amargo variará según el adsorbente utilizado. Aunque el experto en la materia conocerá cómo seleccionar las condiciones apropiadas para llevar a cabo la extracción por lotes, lo siguiente se proporciona a título ilustrativo.  
40

A título de ejemplo, al utilizar polivinilpirrolidona (PVP), la proporción entre adsorbente y composición de compuesto amargo puede ser de aproximadamente 15 g de PVP para aproximadamente 200 ml de composición de compuesto amargo. Esta proporción generalmente resulta en una adsorción de por lo menos aproximadamente 95% de los compuestos amargos en aproximadamente 10 minutos. En comparación con la caseína como adsorbente, que presenta una proporción de aproximadamente 15 g de caseína para aproximadamente 200 ml de composición de compuesto amargo y que típicamente resulta en una adsorción de los compuestos amargos de sólo aproximadamente 50% a 60%. De esta manera, en este último caso, puede resultar preferente utilizar una proporción de caseína a composición de compuesto amargo de aproximadamente 30 g de caseína para aproximadamente 200 ml de composición de compuesto amargo. La utilización de esta última proporción de caseína a composición de compuesto amargo generalmente puede proporcionar una adsorción de por lo menos aproximadamente 80% del compuesto amargo presente en la fuente de compuesto amargo.  
45  
50  
55

Alternativamente, al utilizar el aislamiento en columna para adsorber los compuestos amargos de la composición de compuesto amargo, puede utilizarse una suspensión de adsorbente y agua para rellenar una columna. La columna puede ser cualquier columna de aislamiento estándar de cualquier tamaño. A continuación, puede eliminarse el adsorbente mediante lavado, bombeando en primer lugar un solvente a través de la columna, y bombeando después  
60 agua a través de la columna. En una forma de realización, el solvente utilizado en la presente memoria puede ser de calidad alimentaria, de manera que las fracciones obtenidas mediante el presente procedimiento resultan aceptables para la utilización en productos alimenticios y para beber. Los solventes aceptables para la utilización pueden comprender cualquier solvente de calidad alimentaria, incluyendo, de manera no limitativa, etanol, acetona, acetato de etilo y mezclas de los mismos.  
65

Tras el lavado de la columna con agua, puede aplicarse una composición de compuesto amargo por la parte

superior de la columna y los compuestos amargos, conjuntamente con cualesquier ácidos cafeoil-quinico y feruloil-quinico libres, pueden resultar adsorbidos por el adsorbente, mientras que la composición de compuesto amargo residual puede pasar a través de la columna, separando eficazmente de esta manera los compuestos amargos y los ácidos libres respecto de la composición de compuesto amargo residual. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición de compuesto amargo residual" se refiere a los componentes de la composición de compuesto amargo que no resultan adsorbidos por el adsorbente, que generalmente incluyen cualquier material orgánico o inorgánico no fenólico (por ejemplo sodio, potasio), cafeína y aromatizantes de café. El experto en la materia conocerá que la cantidad de la composición de compuesto amargo que puede aplicarse en la columna puede depender de la naturaleza y cantidad de adsorbente presente dentro de la columna, lo que a su vez depende del tamaño de la misma. Por ejemplo, al utilizar poliamida como el adsorbente y la infusión de café como la composición de compuesto amargo, típicamente puede aplicarse aproximadamente 12 a 15 ml de infusión de café por cada aproximadamente 1 gramo de poliamida. El experto en la materia conocerá cómo seleccionar un tamaño de columna y adsorbente a partir de la proporción anteriormente indicada de adsorbente a composición de compuesto amargo.

Tras producirse un contacto suficiente entre la composición de compuesto amargo y adsorbente para adsorber los compuestos amargos y los ácidos cafeoil-quinico y feruloil-quinico libres, puede eliminarse el adsorbente respecto de la composición de compuesto amargo residual en caso necesario, y lavarse. En el caso de que se utilice el aislamiento en columna, el adsorbente que comprende los compuestos amargos se separará automáticamente del compuesto amargo residual durante el procedimiento de aislamiento y, de esta manera, no resulta necesaria una eliminación posterior. Sin embargo, el adsorbente puede lavarse mediante elución de la columna con varios volúmenes de columna de agua. Por otra parte, en el caso de que se utilice la extracción por lotes, el adsorbente puede separarse mediante filtración respecto de la composición de compuesto amargo residual y nuevamente lavarse opcionalmente con agua. El lavado con agua puede ayudar a eliminar cualquier composición de compuesto amargo residual que pueda encontrarse presentes sobre el adsorbente. En ambos casos, la cantidad de agua utilizada, así como el número de ciclos de lavado, no son críticos ya que generalmente se produce una pérdida muy reducida de los compuestos amargos deseados durante este procedimiento de lavado. Sin embargo, deben evitarse las condiciones alcalinas debido a la inestabilidad de los compuestos amargos bajo condiciones alcalinas.

En este punto la composición de compuesto amargo residual puede presentar un sabor similar al té que consiste en atributos de sabor ácido y astringente sin amargor perceptible. Si se desea, la composición de compuesto amargo residual puede añadirse a bebidas de café que presentan un amargor sustancial, tales como, por ejemplo, cafés Robusta de tueste rápido, o cafés ligeramente torrefactos, con el fin de reducir el amargor de los mismos. Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, se cree que en combinación con una bebida de café muy amarga, la composición de compuesto amargo residual puede reducir el amargor intenso, manteniendo simultáneamente otros atributos del café, tales como la acidez, los niveles de cafeína y el contenido de minerales, resultando de esta manera en una mezcla más equilibrada. Aunque esta utilización de la composición de compuesto amargo residual ciertamente es aceptable, los compuestos amargos que son adsorbidos al adsorbente pueden procesarse adicionalmente antes de que puedan utilizarse para mejorar el sabor de los productos alimenticios y para beber.

#### ii. Desorción de los compuestos amargos respecto del adsorbente

Tras completar las etapas anteriormente indicadas, los compuestos amargos entonces pueden desorberse respecto del adsorbente con el fin de obtener un aislado del compuesto amargo. Al contrario que la técnica anterior, que típicamente considera que cualesquier componentes amargos separado de una infusión de café son materiales de desecho, los presentes inventores inesperadamente han descubierto que los presentes aislados amargos pueden añadirse a productos alimenticios y para beber para mejorar el sabor de los mismos.

De manera similar a la adsorción, la etapa de desorción también puede llevarse a cabo mediante extracción por lotes o extracción en columna. Para la extracción por lotes, el adsorbente que comprende los compuestos amargos puede resuspenderse en un solvente. Los solventes aceptables para la utilización en la presente memoria pueden comprender cualquiera de los solventes de calidad alimentaria anteriormente indicados capaces de eliminar los compuestos amargos del adsorbente, incluyendo, de manera no limitativa, etanol, acetona y mezclas de los mismos. Dependiendo del adsorbente y solvente utilizados, la desorción puede llevarse a cabo bajo diversas condiciones de temperatura. Por ejemplo, al utilizar etanol como el solvente, el solvente puede estar caliente (entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C) al utilizar PVP como el adsorbente, o a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) al utilizar poliamida y/o caseína como el adsorbente. El experto en la materia conocerá cómo seleccionar la temperatura apropiada según el adsorbente y solvente utilizados. La mezcla de adsorbente/solvente se agita durante aproximadamente 15 minutos para proporcionar soporte a la desorción, después de lo cual el adsorbente puede separarse mediante filtración y recogerse un aislado de compuesto amargo. Este procedimiento puede repetirse varias veces y combinarse los aislados de compuesto amargo.

En el caso de que se utilice la extracción en columna, ésta puede eluirse con varios volúmenes de columna de solvente. En este caso, los presentes inventores han descubierto inesperadamente que el aislado del compuesto amargo se eluye cuantitativamente del adsorbente, mientras que otros materiales fenólicos, tales como los ácidos

cafeoil-quinico o feruloil-quinico libres tienden a ser adsorbidos sobre la resina.

5 Con independencia del método utilizado, el aislado de compuesto amargo resultante opcionalmente puede tratarse adicionalmente. Por ejemplo, el aislado de compuesto amargo puede concentrarse bajo vacío, tal como mediante evaporación giratoria, hasta alcanzar una concentración deseada, o secarse por completo. Además, el aislado de compuesto amargo puede purificarse adicionalmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membrana o extracción con solvente, con el fin de eliminar cualquier odorante residual, tal como 4-vinilguaiacol, que proporciona notas ahumadas.

10 Tras recoger el aislado de compuesto amargo, y opcionalmente concentrarlo o purificarlo adicionalmente, puede utilizarse en productos alimenticios y para beber.

## II. Utilización del aislado de compuesto amargo

15 En este punto, puede utilizarse el aislado de compuesto amargo en productos alimenticios y para beber para mejorar los sabores de los mismos. En una forma de realización, el aislado de compuesto amargo puede comprender por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por 3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-dicafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinida, 3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinida, quinida esterificada con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, cis-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán y mezclas de los mismos. Dichos compuestos pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o sintéticas tostadas de ácido tal como se ha indicado anteriormente, o pueden sintetizarse directamente.

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, los presentes aislados de compuesto amargo pueden añadirse a cualquier producto alimenticio o para beber con el fin de proporcionar un amargor único como el del café. Entre algunos de los productos más comunes que se benefician de la adición de los compuestos amargos se incluyen, de manera no limitativa, café instantáneo, café descafeinado, café torrefacto y molido, cafés listos para tomar, concentrados de café, cafés cremosos con o sin saborizantes añadidos, leche con chocolate, chocolate, helado y dulces. Debido a los diferentes ingredientes que constituyen los productos mencionados anteriormente, el aislado de compuesto amargo puede presentar un efecto diferente sobre los diferentes productos alimenticios y para beber a los que se añaden.

35 Respecto a los productos de bebida de café, los presentes inventores han descubierto que los cafés y bebidas de café instantáneos, descafeinados y tostados molidos, en particular, pueden beneficiarse de la adición de aislados de compuesto amargo debido a que estos productos presentan naturalmente un contenido más bajo de dichos compuestos de sabor amargo. Durante el procesamiento instantáneo, los compuestos amargo pueden resultar destruidos por las duras condiciones de la extracción utilizadas, mientras que durante el descafeinado, los precursores de ácido pueden extraerse parcialmente, resultando en niveles de compuesto amargo más bajos después del tueste. Los torrefactos pueden contener cantidades menores de compuestos amargos en comparación con el tueste ligero debido a que estos compuestos amargos se forman pronto durante el procedimiento de tueste y pueden resultar destruidos bajo condiciones de tueste prolongadas. De esta manera, mediante la adición del aislado de compuesto amargo a dichos productos, puede mejorarse el sabor global del producto, con el fin de proporcionar un producto más equilibrado. Además, los presentes inventores han encontrado que, conjuntamente con la mejora del sabor, puede mejorarse la propiedad general de cuerpo, la intensidad y la sensación en boca de estos productos de café. Los productos de café anteriormente indicados pueden comprender cualquier forma, incluyendo, de manera no limitativa, los preparados de café, los cafés listos para tomar o los cafés concentrados.

50 Respecto a los alimentos y bebidas no basados en el café, tales como el chocolate, los dulces y la leche, los presentes inventores inesperadamente han encontrado que la adición de aislados de compuesto amargo a dichos productos puede complementar los sabores de los mismos al proporcionar un sabor típico de un café recién preparado. La obtención de un buen sabor de café en alimentos y bebidas no basados en el café puede resultar bastante difícil, ya que con frecuencia implica utilizar una diversidad de aromatizantes caros e inestables. En contraste, debido a que las fuentes de compuesto amargo indicadas en la presente memoria generalmente se encuentran fácilmente disponibles, la utilización de aislados de compuesto amargo puede proporcionar un modo menos caro, conveniente y natural de saborizar un producto. Además, los aislados de compuesto amargo puede proporcionar el sabor único y característico típico del café recién preparado en casos en los que con frecuencia puede resultar difícil conseguir un resultado similar utilizando los saborizantes actualmente disponibles. Además, este sabor de café recién preparado puede proporcionarse mediante los aislados de compuesto amargo sin adición de cafeína al producto. Sin embargo, debe indicarse que los presentes aislados de compuesto amargo pueden utilizarse conjuntamente con los saborizantes disponibles actualmente con el fin de proporcionar una percepción global de sabor de café más natural, compleja y realista.

65 El experto en la materia conocerá que la cantidad de aislado de compuesto amargo añadida a cada uno de los

productos alimenticios y para beber anteriormente indicados difiere según las preferencias de sabor y el sabor deseado. Pueden encontrarse ilustraciones representativas de la utilización de aislados de compuesto amargo para mejorar el sabor de los productos alimenticios y para beber en la presente memoria, en los ejemplos.

## 5 Métodos analíticos

Los parámetros utilizados para cuantificar elementos de la presente invención se cuantifican mediante métodos analíticos particulares. Los métodos se describen en detalle del modo siguiente.

### 10 Método para evaluar los compuestos amargos presentes en una composición de compuesto amargo

Los compuestos amargos, tales como las quinidas y/o fenilindanos amargos, presentes en una composición de compuesto amargo se analizan mediante HPLC-DAD y HPLC-MS, respectivamente.

15 Para el análisis de los ácidos cafeoil-quinicos, las cafeoil-quinidas y los ácidos feruloil-quinicos, el sistema consistía de un módulo de separación 2695 (Waters, Milford, MA, USA), un detector fotométrico 2996 en serie (Waters, Milford, MA, USA) y un espectrómetro de masas Micromass ZMD (proporcionado por Waters, Milford, MA, USA).  
 20 Funcionando en modo de electropulverización positiva, se llevó a cabo el análisis de EM en modo de barrido y en modo de seguimiento de ión único utilizando  $m/z=355$  para los ácidos cafeoil-quinicos,  $m/z=337$  para las cafeoil-quinidas y  $m/z=369$  para los ácidos feruloilquinicos. A título meramente ilustrativo, se utilizó infusión de café, aunque se debe apreciar que puede utilizarse cualquier composición de compuesto amargo. Se inyectaron 10  $\mu$ l de infusión de café directamente en la columna analítica Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm, Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA) mantenida a 40°C. Se mantuvo un caudal de 0,8 ml/min y se realizó el seguimiento del efluente a 326 nm, se llevó a  
 25 cabo la cromatografía partiendo de una mezcla (75/25, v/v) de tampón acuoso de formato amónico (250 mmoles, pH 3,5) y metanol, incrementando después el contenido de metanol hasta el 30% en 30 minutos, seguido del incremento hasta 50% en 15 minutos y finalmente el incremento hasta 100% en 10 minutos. Este contenido de metanol se mantuvo durante 10 minutos adicionales. Bajo estas condiciones, los ácidos cafeoil-quinicos libres eluyeron tras 6,07 minutos, 8,53 minutos y 8,71 minutos; los ácidos feruloil-quinicos eluyeron tras 16,30 minutos y 16,78 minutos, las cinco cafeoil-quinidas eluyeron tras 17,4 minutos, 18,1 minutos, 19,1 minutos, 20,2 minutos y 22,3  
 30 minutos, en forma de picos discretos. Además, una fracción de elución tardía de sabor intensamente amargo y altamente compleja que comprendía numerosos isómeros de ácido quinico múltiplemente esterificado y fenilindanos eluyó en forma de un pico complejo entre 50 minutos y 56 minutos.

35 Para el análisis de las dicafeoil-quinidas, las feruloil-quinidas, las diferuloil-quinidas, así como los fenilindanos, se acopló una HPLC Agilent serie 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) a un espectrómetro de masas API 4000 Q-Trap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) funcionando en el modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM) para detectar los iones negativos. Durante un periodo de 150 ms, se utilizaron las reacciones de transición de masas  $m/z$  497→335 y 497→161 para la detección de las dicafeoil-quinidas,  $m/z$  349→193 y 349→175 para las feruloil-quinidas, 525→193 y 525→175 para las diferuloil-quinidas y 271→146 y 271→109 para el cis-/trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán) y 271→161 y 271→109 para el cis-/trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán. Se utilizó aire de grado cero como gas de nebulizador (35 psi) y como gas turbo (400°C) para el  
 40 secado de solvente (45 psi).

45 Para el seguimiento de las dicafeoil-quinidas y diferuloil-quinidas individuales, se llevó a cabo cromatografía en una columna analítica (Synergi Fusion-RP, 150 x 2 mm d.i., 4  $\mu$ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Tras la inyección de la muestra (10  $\mu$ l), se llevó a cabo el análisis utilizando un gradiente, partiendo de una mezcla (60/40, v/v) de ácido fórmico acuoso (al 1%) y metanol, incrementando el contenido de metanol hasta el 60% en 15 minutos, y después hasta 100% en 25 minutos, manteniendo simultáneamente un caudal de 250  $\mu$ l/min.

50 Para el seguimiento de las feruloil-quinidas individuales, se llevó a cabo cromatografía en una columna analítica Phenyl-Hexil (250 x 4,6 mm, Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Tras la inyección de la muestra (10  $\mu$ l), se llevó a cabo la cromatografía partiendo de una mezcla (75/25, v/v) de tampón acuoso de formato amónico (500 mmoles, pH 3,5) y metanol, incrementando después el contenido de metanol hasta el 28% en 34,5 minutos, seguido del incremento hasta el 50% en 10 minutos, y finalmente incrementando hasta el 100% en 5 minutos, manteniendo  
 55 simultáneamente un caudal de 1,0 ml/min.

60 Para el seguimiento de los fenilindanos individuales, se llevó a cabo cromatografía en una columna analítica (Synergi Fusion-RP, 150 x 2 mm d.i., 4  $\mu$ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania, o Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 2,1 mm d.i., 4  $\mu$ m, Agilent, Waldbronn, Alemania). Tras la inyección de la muestra (5 a 20  $\mu$ l), se llevó a cabo el análisis utilizando un gradiente, partiendo de una mezcla (75/25, v/v) de ácido fórmico acuoso (al 0,1%) y acetonitrilo, e incrementando el contenido de acetonitrilo hasta el 28% en 5 minutos, después incrementando hasta el 30% en 20 minutos y seguidamente hasta el 100% en 5 minutos, manteniendo simultáneamente un caudal de 250  $\mu$ l/min.

**Ejemplos****Ejemplo 1**

5 Se suspendieron aproximadamente 500 gramos de poliamida (SC-6, Machery & Nagel, Easton, PA) en aproximadamente 1.500 ml de agua y se dejó que se hinchasen durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente la temperatura ambiente. Se eliminaron los finos que flotaban sobre la superficie y la suspensión se utilizó para rellenar una columna XK 50/100 (100 cm x 5,0 cm, Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) hasta  
10 obtener una altura de lecho de columna de aproximadamente 90 cm. Mediante la utilización de tubos Tefzel® (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) y tubos de silicona Masterflex® (tamaño 16, Cole Palmer, Chicago, IL) se conectó la columna a una bomba peristáltica (Baker Technical Industries). Para eliminar cualquier impureza, la columna se enjuagó con etanol 200 proof (Aaper, Shelbyville, KY) durante 8 horas a un caudal de aproximadamente 14,7 ml/min. A continuación, se cambió la fase móvil a agua y se continuó eluyendo la columna durante aproximadamente 12 horas adicionales.

15 Se prepararon aproximadamente seis litros de infusión de café en lotes que contenían aproximadamente 50 g de café tostado y molido (Folgers® Gourmet Supreme decafé) y 1.100 ml de agua utilizando una cafetera. A continuación, la infusión de café se enfrió hasta la temperatura ambiente en un baño de hielo. Se aplicaron aproximadamente 5 litros de la infusión de café en la columna a un caudal de aproximadamente 14,5 ml/min y después se lavó la  
20 columna con agua (Milli-Q®) durante aproximadamente 12 horas. Finalmente, se cambió la fase móvil por etanol 200 proof (Aaper, Shelbyville, KY) y tras expulsar el volumen muerto acuoso de la columna (aproximadamente 1,4 litros), se recogió el efluente etanólico que contenía el aislado de compuesto amargo. Tras recoger aproximadamente 5,6 litros del aislado, que eran equivalentes a aproximadamente cuatro volúmenes de columna, se finalizó el procedimiento de aislamiento. Se eliminó el etanol del aislado mediante evaporación giratoria (Buechi, New Castle, DE) lleva a cabo a aproximadamente 40°C y aproximadamente 70 mbar y el residuo seco remanente del aislado de  
25 compuesto amargo se disolvió en aproximadamente 50 ml de etanol 200 proof (Aaper, Shelbyville, KY). Se eliminó cualquier material insoluble existente mediante centrifugación. El aislado de compuesto amargo se analizó utilizando los métodos analíticos descritos en la presente memoria y se descubrió que comprendía quinidas y fenilindanos amargos aceptables para la utilización en productos alimenticios y para beber.

30 **Ejemplo 2**

Se mezclaron aproximadamente 1 gramo de ácido clorogénico (Aldrich, Milwaukee, WI) y aproximadamente 2 ml de agua (Milli-Q®) y posteriormente se secaron a aproximadamente 70°C. A continuación, los residuos se calentaron en seco durante aproximadamente 18 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 220°C y 230°C. Los  
35 productos de reacción resultantes se disolvieron en agua caliente (Milli-Q®, 100 ml) y tras enfriar hasta aproximadamente la temperatura ambiente, se extrajeron con acetato de etilo (5 x 25 ml, Aldrich, Milwaukee, WI). Se eliminó el solvente de las capas orgánicas agrupadas y se introdujeron los residuos en etanol/agua (30/70, v/v; 10 ml) para el procesamiento posterior.

40 En caso de necesitarse la eliminación del ácido clorogénico residual, se suspendió poliamida (MN-SC-6, Machery & Nagel, Easton, PA) en agua y se utilizó para rellenar una columna de vidrio (300 x 30 mm) hasta aproximadamente 160 mm. Se acondicionó la poliamida con una mezcla de aproximadamente 250 ml de etanol y aproximadamente 250 ml de agua y los residuos disueltos en agua (Milli-Q) se aplicaron en la columna. La columna se lavó con  
45 aproximadamente 750 ml de agua y se eluyeron los compuestos amargos utilizando aproximadamente 500 ml de etanol. Finalmente, se concentró el aislado de compuesto amargo etanólico mediante evaporación giratoria al vacío (45°C, 70 mbar) hasta una concentración deseada. El aislado de compuesto amargo se analizó utilizando los métodos analíticos descritos en la presente memoria y se encontró que comprendía quinidas y fenilindanos amargos aceptables para la utilización en productos alimenticios y para beber.

50 **Ejemplo 3**

Se secaron aproximadamente 0,250-0,500 ml del aislado etanólico de compuesto amargo del ejemplo 1 (el equivalente a aproximadamente 25 a 50 mg de peso seco) bajo un flujo de nitrógeno y posteriormente se disolvió en  
55 aproximadamente 100 ml de bebida de café instantáneo preparado a partir de aproximadamente 1,5 g de café instantáneo Folgers® y aproximadamente 100 ml de agua. En comparación con una bebida de café instantáneo sin el aislado añadido de compuesto amargo, la bebida de café instantáneo que presentaba el aislado añadido de compuesto amargo presentaba un sabor mejorado de café recién preparado en combinación con un cuerpo e intensidad incrementados, mientras que la nota de mal sabor del hidrolizado, que es típica del café instantáneo, se reduce. Globalmente, la bebida de café instantáneo suplementada con el aislado de compuesto amargo se percibe como de sabor mucho más similar al de un café recién preparado.

60 **Ejemplo 4**

65 Se secaron aproximadamente 0,1 a 0,25 ml de aislado etanólico de compuesto amargo del ejemplo 1 (el equivalente a aproximadamente 10 a 25 mg de peso seco) bajo un flujo de nitrógeno y posteriormente se disolvieron en

aproximadamente 100 ml de café descafeinado tostado y molido recién preparado utilizando aproximadamente 33,3 g de café descafeinado Folgers Gourmet Supreme<sup>®</sup> y aproximadamente 1.420 ml de agua. Una comparación con café descafeinado no suplementado con el aislado de compuesto amargo muestra que el café que presenta el aislado amargo añadido presenta una intensidad y cuerpo incrementados y una sensación en boca mejorada.

5

**Ejemplo 5**

Se fundieron aproximadamente 50 g de chocolate con leche (Milka<sup>®</sup>) sobre un baño de agua caliente y se añadieron 0,6 ml (aproximadamente 60 mg de peso seco) del compuesto etanólico amargo del ejemplo 1 y se distribuyó uniformemente mediante agitación. A continuación, se transfirió la combinación de chocolate/aislado de compuesto amargo a un recipiente de cristalización y se introdujo en una nevera para endurecerla durante aproximadamente 30 minutos. El chocolate, que presenta entonces el aislado de compuesto amargo añadido, muestra un carácter similar al del chocolate negro, un buen sabor de café y una buena sensación en boca similar a la del café.

10

15 **Ejemplo 6**

Se disolvieron aproximadamente 15 g de cacao en polvo doble chocolate Nesquick<sup>®</sup> (Nestlé) en aproximadamente 235 ml de leche y se calentaron en un microondas. A continuación, se añadieron aproximadamente 0,3 ml del aislado etanólico de compuesto amargo del ejemplo 1 (el equivalente a aproximadamente 30 mg de peso seco) a la bebida caliente bajo agitación con el fin de mejorar el sabor de la misma. El chocolate con leche mejorado mostraba un buen sabor a café y una buena sensación en boca similar a la del café.

20

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para mejorar el sabor de un producto alimenticio o para beber, caracterizado porque el procedimiento presenta las etapas siguientes:
- a. poner en contacto una composición de compuesto amargo, comprendiendo dicha composición de compuesto amargo por lo menos un compuesto amargo seleccionado de entre el grupo constituido por quinidas, fenilindanos y mezclas de los mismos, con un adsorbente para adsorber dicho por lo menos un compuesto amargo de la composición de compuesto amargo, siendo dicho adsorbente seleccionado de entre el grupo constituido por polímeros naturales que contienen grupos amida, polímeros sintéticos que contienen grupos amida y combinaciones de los mismos,
  - b. desorber dicho por lo menos un compuesto amargo del adsorbente con un solvente para obtener un aislado de compuesto amargo; y
  - c. añadir el aislado de compuesto amargo a un producto alimenticio o para beber para mejorar el sabor del mismo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición de compuesto amargo se obtiene a partir de por lo menos un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido clorogénico tostado, ácido cafeico tostado y mezclas de los mismos, obtenido a partir de una fuente de ácido natural o sintética.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición de compuesto amargo contiene infusión de café, extracto de café o mezclas de los mismos.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la fuente de ácido natural es un material vegetal que contiene un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido clorogénico, ácido cafeico y mezclas de los mismos.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la fuente de ácido natural se selecciona de entre el grupo que comprende granos de café, bayas de café maduras, hojas de boniato, patatas, manzanas, piñas, cerezas, melocotones y una combinación de los mismos.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el adsorbente se selecciona de entre el grupo constituido por poliamida, polivinilpirrolidona, caseína, zeína y combinaciones de los mismos.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el solvente es un solvente de calidad alimentaria.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el solvente se selecciona de entre el grupo constituido por etanol, acetona, acetato de etilo y mezclas de los mismos.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el aislado de compuesto amargo contiene por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por 3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-dicafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinida, 3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinida; quinida esterificada con uno o más de entre ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, cis-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán y mezclas de los mismos.
10. Aislado de compuesto amargo para mejorar el sabor de un producto alimenticio o para beber, caracterizado porque contiene por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-dicafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinida, 3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinida; quinida esterificada con uno o más ácidos seleccionados de entre el grupo constituido por ácido p-coumárico y ácido 3,4-dimetoxicinámico; cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán, trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihidroxifenil)indán y mezclas de los mismos.
11. Aislado de compuesto amargo según la reivindicación 10, en el que dicha por lo menos una quinida esterificada con un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido p-coumárico y ácido 3,4-dimetoxicinámico se esterifica adicionalmente con un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido cafeico y ácido ferúlico.
12. Utilización de un aislado de compuesto amargo para mejorar el sabor de un producto alimenticio o para beber, en la que dicho aislado de compuesto amargo contiene por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por 3-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil- $\gamma$ -quinida, 5-O-cafeoil-epi- $\delta$ -quinida, 5-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil- $\gamma$ -quinida, 3,4-O-dicafeoil- $\gamma$ -quinida, 4-O-cafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-dicafeoil-epi-

5  $\delta$ -quinida, 4,5-O-dicafeoil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 4-O-feruloil-muco- $\gamma$ -quinida, 5-O-feruloil-epi- $\delta$ -quinida, 3,4-O-diferuloil- $\gamma$ -quinida, 3,5-O-diferuloil-epi- $\delta$ -quinida, 4,5-O-diferuloil-muco- $\gamma$ -quinida, quinida esterificada con por lo menos un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, cis-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihroxifenil)indán, trans-5,6-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihroxifenil)indán, cis-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihroxifenil)indán, trans-4,5-dihidroxi-1-metil-3-(3',4'-dihroxifenil)indán y mezclas de los mismos.

10 13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dicho producto alimenticio o para beber se selecciona de entre el grupo constituido por café instantáneo, café descafeinado, café tostado y molido, café listo para beber, concentrados de café, café cremoso con o sin sabores adicionales, leche con chocolate, chocolate, helado y dulces.