

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 691**

51 Int. Cl.:

**A23F 5/02** (2006.01)

**A61K 36/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09737933 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2282642**

54 Título: **Productos que contienen ácidos fenólicos descarboxilados derivados de los ácidos clorogénicos del café, y empleo de los mismos**

30 Prioridad:

**30.04.2008 EP 08155434**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.10.2013**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**BEL-RHLID, RACHID;  
KRAEHENBUEHL, KARIN;  
CAVIN, CHRISTOPHE;  
RAAB, THOMAS WOLFGANG y  
PAGE, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 425 691 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).

## DESCRIPCION

Productos que contienen ácidos fenólicos descarboxilados derivados de los ácidos clorogénicos del café, y empleo de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al empleo de los ácidos fenólicos descarboxilados derivados del ácido clorogénico del café así como también, de los productos que contienen ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café, especialmente un extracto de café, y los métodos para la fabricación de dichos productos.

## ANTECEDENTES

El café y los compuestos activos del café como por ejemplo la cafeína y los diterpenos (por ejemplo, el cafestol, el kahweol) se ha demostrado que inducen la destoxicación de las enzimas (por ejemplo, las glutatión-S-transferasas, GST) (Cavin C. et al., 1998. Los diterpenos específicos del café, el cafestol y el kahweol, protegen contra la genotoxicidad inducida por la aflatoxina B1 a través de un mecanismo dual. "Carcinogénesis" 19, 1369-1375, Cavin, C. et al., 2003. Los diterpenos del café evitan la genotoxicidad del benzo[a]pireno en los sistemas de cultivo de la rata y humanos. "Biochemical Biophysical Research Communication" ("Comunicaciones de la Investigación Bioquímica y Biofísica"), 306, 488-495; Huber, W et al., 2002a. "Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol" ("Potenciación de las enzimas quimioprotectoras glucuronosil transferasa y glutatión transferasa en órganos específicos de la rata mediante los componentes del café kahweol y cafestol"). Archive of Toxicology ("Archivo de Toxicología"), 76, 209-217). Se ha demostrado además una mayor actividad de la GST por el café en los humanos después del consumo de 800 ml de café durante 5 días (Steinkellner, H. et al., 2005. El consumo de café induce la GSTP en el plasma y protege los linfocitos contra los daños en el ADN inducidos por el (+/-)-anti-benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido: resultados de las pruebas controladas de la intervención humana. Mut. Res. 591 264-275).

Esta clase de actividad antioxidante es conocida por proteger contra el "estrés oxidante" reduciendo el daño de los radicales libres que pueden ser implicados por ejemplo, en el cáncer, enfermedades cardíacas, trastornos degenerativos del cerebro y el envejecimiento.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y la forma más corriente de demencia, siendo los síntomas, por ejemplo, la pérdida de memoria, la confusión, los cambios de humor, y el deterioro cognitivo. Es característica por la presencia de placas amiloides extracelulares y una maraña neurofibrilar intraneuronal en el cerebro, de la cual el principal constituyente son los agregados fibrilares de 39-42 residuos péptidos que se conocen con el nombre de amiloide beta-proteína (A $\beta$ ). La formación de fibrillas de A $\beta$  se cree que juega un papel central en la etiología de la AD. Varias mutaciones patogénicas de la AD se ha demostrado que dan como resultado, mayores niveles de A $\beta$ , especialmente de la variante A $\beta$ 42. La formación de fibrillas amiloides se cree por lo tanto que es la causa de la progresión de la enfermedad y la neurodegeneración en la AD. Se ha demostrado mediante estudios in vitro que la formación de fibrillas A $\beta$  tiene lugar mediante un mecanismo complejo de múltiples pasos que abarca intermedios oligoméricos discretos solubles denominados ADDLS ó protofibrillas (PF), las cuales desaparecen después de la formación de las fibrillas. Esto sugiere que las PF pueden ser especies patogénicas de la AD. Un número de otras enfermedades en humanos y animales comprenden la agregación de proteínas, por ejemplo la degeneración macular, la encefalopatía esponjiforme bovina (BSE), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y la diabetes.

La patente WO 02/085397 describe un método para la extracción de los granos de café verde en crudo, y el producto final de la extracción del café. El método produce un producto final del extracto de café que contiene compuestos fenólico.

La patente JP-A- 2006/020526 describe una composición con sabor de café que tiene un aroma y un sabor mejorados. Además la patente JP-A- 2006/020526 describe un extracto de café tostado que tiene un efecto antioxidante.

La patente WO-A- 00/4704 describe el empleo del 4-VG como un antioxidante y como un saborizante funcional. No tienen ninguna relación con los extractos de café.

La patente WO-A-2004/05673 describe un proceso inducido por microondas para la preparación de 4-vinilfenoles sustituidos, entre los cuales se encuentran vinilfenoles para perfumería y saborizantes.

La patente US-A- 2007/0224668 describe el 4-vinilguayacol producido empleando un E. coli recombinante, el cual contiene un gen de la descarboxilasa del Bacillus pumilis.

La patente EP 1674 196 describe una composición para la remodelación del hueso, que contiene compuestos de metoxifenilo.

Con el fin de aumentar los efectos beneficiosos saludables de los productos alimenticios y bebidas, existe el deseo de producir productos con una actividad antioxidante mayor, así como también otras actividades biológicas beneficiosas, y encontrar fuentes naturales de antioxidantes y otros compuestos con actividades biológicas beneficiosas, que pueden ser empleadas para potenciar las propiedades de los productos alimenticios y de las bebidas así como por ejemplo, en cosmética y en productos médicos.

#### Resumen de la invención

Los inventores han descubierto ahora que los ácidos fenólicos descarboxilados, derivados del ácido clorogénico del café, tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como también son efectivas para inhibir y/o retardar la agregación de péptidos beta amiloides, y que pueden ser producidos a partir de un extracto de café, proporcionando un extracto de café con propiedades antioxidantes y anti inflamatorias potenciadas. En consecuencia, la invención se refiere a un método para la producción de un extracto de café que comprende un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, el cuál método comprende: a) la extracción de los granos de café con agua y/o vapor, para producir un extracto de café, y b) el tratamiento del extracto de café para hidrolizar el ácido clorogénico presente en el extracto para obtener el ácido fenólico, y para la descarboxilación del ácido fenólico resultante. En otros aspectos, la invención se refiere a un extracto de café que comprende un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol y mezclas de los mismos, como se describe en la reivindicación 5; a un método de producción de un producto alimenticio o bebida como se describe en la reivindicación 7, y al empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de un ensayo sobre la capacidad del 4-vinilcatecol para reducir y/o bloquear la formación de fibrillas de amiloide a partir de los péptidos monoméricos beta amiloides. Las barras blancas representan el control; las barras gris claro representan el ratio entre el A $\beta$ 42 y el 4-vinilcatecol de 1:0,5 (ratio molar); las barras gris oscuro representan el ratio entre el A $\beta$ 42 y el 4-vinilcatecol de 1:2 ((ratio molar).

La figura 2 muestra los resultados de un ensayo sobre la capacidad del 4-vinilcatecol para reducir y/o bloquear la formación de fibrillas de amiloides a partir de las protofibrillas de los péptidos beta amiloides. Las barras blancas representan el control; las barras gris claro representan un ratio entre el A $\beta$ 42 y el 4-vinilcatecol de 1:0,5 (ratio molar); las barras gris obscuro representan un ratio entre el A $\beta$ 42 y el 4-vinilcatecol de 1:2 (ratio molar).

#### Descripción detallada de la invención

Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres formados entre los ácidos trans-cinámicos y el ácido quínico. Los ácidos clorogénicos están naturalmente presentes en el café, principalmente como mono- y di-ésteres del ácido quínico y grupos fenólicos (por ejemplo, cafeico, ferúlico, cumárico, metoxicinámico) unidos en diferentes posiciones. Los ácidos clorogénicos pueden ser hidrolizados para dar compuestos fenólicos, como por ejemplo, el ácido cafeico y el ácido ferúlico. Estos compuestos fenólicos pueden ser transformados más tarde mediante descarboxilación. Esta invención se refiere a ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café. Con el término ácido clorogénico del café se designan uno o más ácidos clorogénicos que se encuentran de forma natural en el café y que contienen un grupo fenólico, tanto si se derivan realmente del café como si se derivan de otra fuente. En una versión preferida, el ácido clorogénico del café se deriva realmente del café. Los ácidos clorogénicos naturalmente presentes en el café son por ejemplo los ácidos cafeoil quínicos (CQA) (como por ejemplo el ácido 3-, 4-, ó 5-cafeoil quínico) y diésteres, ácidos feruloil quínicos (FQA) (como por ejemplo los ácidos 3-, 4-, ó 5-feruloil quínicos), y diésteres, y los ácidos dimetoxicinamoil quínicos (DMCQA) (como por ejemplo el ácido 3-, 4-, ó 5-dimetoxicinamoil quínico) y los diésteres.

0015 Los ácidos clorogénicos del café pueden hidrolizarse para generar ácidos fenólicos, por ejemplo, el CQA, el cual puede hidrolizarse para generar ácido cafeico (CA), el FQA puede ser hidrolizado para generar ácido ferúlico (FA), y el DMCQA puede ser hidrolizado para generar ácido dimetoxicinámico (DMCA). Los ácidos fenólicos generados por la hidrólisis de los ácidos clorogénicos del café pueden además descarboxilarse para generar ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café; por ejemplo el CA puede descarboxilarse para generar el 4-vinilcatecol, el FA puede descarboxilarse para generar el 4-vinilguayacol, y el DMCA puede descarboxilarse para generar el 4-vinilveratrol.

El ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café se selecciona entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol y mezclas de los mismos.

La invención se refiere a un extracto de café que comprende el ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café. El extracto de café de la invención puede ser un extracto de granos de café tostado, de granos de café verde, o de ambos.

El extracto de café comprende por lo menos 0,1 miligramos en total, de 4-vinilcatecol, 4-vinilguayacol y 4-vinilveratrol por gramo de materia seca como por ejemplo, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 5 ó por lo menos 20 miligramos por gramo de materia seca. En otra versión, el extracto de café comprende por lo menos 0,1 miligramos de 4-vinilcatecol por gramo de materia seca, como por ejemplo por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 5 ó por lo menos 20 miligramos por gramo de materia seca.

De acuerdo con el método de la invención, los ácidos clorogénicos pueden transformarse en ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café mediante hidrólisis del ácido clorogénico en ácido fenólico y descarboxilación del ácido fenólico resultante, como se ha descrito más arriba.

Las reacciones de hidrólisis y de descarboxilación pueden efectuarse separadamente o pueden solaparse en el tiempo.

La transformación de los ácidos clorogénicos puede efectuarse mediante cualquier método adecuado. En una versión de la invención, la transformación se realiza mediante uno o más microorganismos capaces de transformar los ácidos clorogénicos en el café. Los microorganismos capaces de transformar los ácidos clorogénicos pueden ser por ejemplo identificados como se describe en los ejemplos de esta solicitud. Microorganismos adecuados pueden ser la levadura, por ejemplo la levadura de panadero; hongos, por ejemplo un *Aspergillus*; o bacterias, por ejemplo bacterias del ácido láctico, por ejemplo un *Lactobacillus*, como por ejemplo el *L. johnsonii* (CNCM I-1225). En una versión de la invención el microorganismo capaz de transformar los ácidos clorogénicos es una bacteria de ácido láctico. En otra versión de la invención se emplean dos o más microorganismos para transformar los ácidos clorogénicos, por ejemplo uno o más microorganismos capaces de hidrolizar los ácidos clorogénicos en ácido fenólico, y uno o más microorganismos capaces de la descarboxilación del ácido fenólico.

La transformación de los ácidos clorogénicos puede efectuarse mediante la incubación del extracto de café con un microorganismo capaz de transformar los ácidos clorogénicos en condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo específico durante el tiempo necesario para lograr la requerida transformación de los ácidos clorogénicos. Las condiciones específicas pueden fácilmente determinarse mediante una persona experta, por ejemplo, con referencia a los ejemplos contenidos en la presente.

En otra versión de la invención, la transformación de los ácidos clorogénicos se efectúa por uno o más microorganismos adecuados mediante el empleo de microorganismos no-replicativos (por ejemplo células microbianas lisadas). Mediante la incubación del extracto de café con células lisadas en las condiciones adecuadas, las enzimas presentes en el lisado de células pueden transformar los ácidos clorogénicos. Células adecuadas pueden ser por ejemplo células de los microorganismos mencionados más arriba. Métodos adecuados para producir el lisado de las células ya son conocidos en la técnica.

La cantidad de microorganismo y condiciones de la transformación deben ser los adecuados para lograr la transformación deseada de los ácidos clorogénicos y puede determinarse por una persona experta en la técnica, mediante métodos rutinarios, por ejemplo empleando los métodos descritos en los ejemplos de la presente.

En otra versión, la transformación de los ácidos clorogénicos se efectúa mediante el empleo de una o más enzimas capaces de transformar los ácidos clorogénicos. En una versión, se emplean por lo menos dos enzimas, por lo menos una enzima capaz de hidrolizar los ácidos clorogénicos para generar el ácido fenólico, y por lo menos una enzima capaz de descarboxilar el ácido fenólico resultante. Una enzima capaz para hidrolizar el ácido clorogénico es por ejemplo una estearasam, por ejemplo, el clorogenato de estearasa derivado del *Aspergillus japonicus* (Kikkoman, Japón). Una enzima adecuada para la descarboxilación de los ácidos fenólicos es por ejemplo una descarboxilasa (EC 4.1.1.X), por ejemplo, una piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1). La transformación enzimática puede efectuarse mediante métodos convencionales para las reacciones enzimáticas, por ejemplo disolviendo o suspendiendo la(s) enzima(s) en el extracto de café en condiciones adecuadas para la actividad de la enzima requerida. La(s) enzima(s) puede(n) ser inactivada(s), por ejemplo calentando después de que haya tenido lugar la transformación. La(s) enzima(s) que debe(n) emplearse puede(n) también inmovilizarse, por ejemplo sobre una membrana o sobre un soporte inerte, y el extracto de café que hay que tratar puede circular sobre la membrana o a través del soporte hasta que se haya logrado el grado de transformación deseado. Cuando se emplean dos o más enzimas, pueden emplearse simultáneamente, o el tratamiento puede efectuarse secuencialmente, por ejemplo, si las condiciones óptimas varían entre las enzimas.

La cantidad de enzima y las condiciones que hay que emplear deben ser las adecuadas para lograr la hidrólisis deseada de los ácidos clorogénicos y la descarboxilación de los ácidos fenólicos, y puede ser determinada por una persona experta mediante métodos rutinarios.

Los granos de café que deben ser extraídos para producir el extracto de café, pueden ser enteros o molidos. En una versión de la invención los granos de café son granos de café verde. En otra versión se co-extraen los granos de café verde con granos de café tostado, es decir se extraen simultáneamente granos de café verde y granos de café tostado en el mismo sistema de extracción para proporcionar un extracto mixto. Los componentes aromáticos más

volátiles pueden separarse de los granos antes de la extracción, por ejemplo, si el extracto tiene que emplearse para la producción de café soluble puro. Los métodos para la separación de los componentes aromáticos volátiles son ya bien conocidos en la especialidad, por ejemplo, a partir de la patente EP 1078576.

5 Los granos de café que deben ser extraídos, pueden extraerse por cualquier método adecuado que proporcione un extracto que contenga los ácidos clorogénicos. La extracción de los granos de café con agua y/o vapor ya es bien conocida en la técnica, por ejemplo a partir de la patente EP 0916 267. El extracto puede someterse a un paso de concentración y puede secarse antes del tratamiento para transformar los ácidos clorogénicos, por ejemplo mediante secado por pulverización o secado por congelación. Si el extracto ha sido secado, puede ser suspendido si es necesario, para efectuar el tratamiento de transformación de los ácidos clorogénicos. El extracto de café puede someterse a cualquier tratamiento adecuado para eliminar los componentes indeseables del extracto antes, durante, o después, de la transformación de los ácidos clorogénicos, por ejemplo para aumentar la concentración del ácido fenólico descarboxilado en el extracto tratado final.

10 El tratamiento del extracto para transformar los ácidos clorogénicos puede efectuarse después o durante la extracción. El extracto puede separarse de los granos de café extraídos antes, durante, o después, del tratamiento para transformar los ácidos clorogénicos. En una versión, el extracto se mantiene separado de los granos de café extraídos después del tratamiento para transformar los ácidos clorogénicos, es decir el extracto no se pone en contacto con los granos de café extraídos de nuevo después del tratamiento para transformar los ácidos clorogénicos. La separación del extracto de los granos de café extraídos puede efectuarse por cualquier método adecuado por ejemplo, por filtración, o por centrifugación. La separación puede efectuarse prácticamente en su totalidad y de manera económicamente factible y necesaria según el empleo deseado del extracto. La separación puede no ser completa al 100 %, por ejemplo, una parte pequeña del material no disuelto de los granos puede todavía estar presente en el extracto después de la separación.

15 La invención se refiere también a un método para la producción de un producto alimenticio o bebida, en donde un extracto de café de la invención se emplea como un ingrediente de dicho producto alimenticio o bebida. En una versión de la invención, el extracto se emplea separadamente de los granos de café extraídos, es decir el material no disuelto de los granos se separa substancialmente mediante separación como se ha descrito en la presente y no se emplea en la producción del alimento del producto alimenticio o bebida. El producto alimenticio o la bebida puede ser cualquier producto alimenticio o bebida conocido en la especialidad. En una versión preferida, el producto alimenticio o bebida es una bebida de café; un café soluble puro; un refresco; un suplemento dietético; un producto lácteo, un producto de cereales; un producto de jugo de frutas o un jugo vegetal; un producto de pastelería, como por ejemplo un producto de chocolate, por ejemplo una bebida de chocolate. Un producto de café soluble puede producirse mediante concentración y secado del extracto de la invención. Antes del secado, el extracto puede ser mezclado con extracto de café que no ha sido tratado para transformar los ácidos clorogénicos, por ejemplo extracto de granos de café tostado, granos de café verde, o ambos. Los métodos para la producción de un producto de café soluble a partir del extracto de café son ya bien conocidos en la técnica. Cuando el extracto se emplea para la producción de un producto de café, los granos que han de ser extraídos pueden haber sido sometidos a una separación para eliminar los aromas volátiles antes de la extracción, por ejemplo, como se ha descrito en la patente EP-A-1078576. Los aromas volátiles pueden volver a añadirse a continuación al extracto después del tratamiento para la hidrólisis de los ácidos clorogénicos, por ejemplo, después del secado, para producir un producto de café soluble aromatizado. Un producto de café soluble producido a partir de un extracto de café de la invención puede ser vendido como tal, o puede por ejemplo mezclarse con crema de leche y/o un edulcorante para preparar una bebida de café que comprende la crema de leche y/o el edulcorante, por ejemplo, un capuchino o un café con leche.

20 También se describe un producto alimenticio o una bebida, que comprende por lo menos 0,1 mg de 4-vinilcatecol y/o derivados metoxilados de los mismos por gramo de materia seca, como por ejemplo, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 5 ó por lo menos 20 mg por gramo de materia seca.

25 Cuando un extracto de café de acuerdo con la invención se emplea como ingrediente de un producto alimenticio o de una bebida, puede añadirse en cualquier paso apropiado del proceso de producción de dicho producto alimenticio o bebida, para lograr el efecto deseado. El extracto puede añadirse en cualquier cantidad adecuada para producir el efecto deseado, por ejemplo, un efecto antioxidante o un efecto antiinflamatorio.

30 También se describe en la misma un producto alimenticio o bebida que comprende el ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café. El producto alimenticio o bebida pueden ser cualquier producto alimenticio o bebida ya conocidos en la técnica. En una versión preferida, el producto alimenticio o bebida es una bebida de café; un café soluble puro; un refresco; un suplemento dietético, un producto lácteo, un producto de cereales, un producto de jugo de frutas o un producto de jugo vegetal; o un producto de pastelería, como por ejemplo un producto de chocolate, por ejemplo una bebida de chocolate. El producto alimenticio o bebida pueden prepararse por ejemplo mediante los métodos descritos en la presente.

#### Empleo del ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café

35 La invención se refiere también al empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, como se describe en las reivindicaciones 9-13. Los ácidos fenólicos descarboxilados que deben emplearse de acuerdo con la invención, pueden producirse por cualquier método

adecuado, por ejemplo, mediante la descarboxilación del ácido cafeico y pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo como compuesto(s) purificado(s). En una versión de la invención, el ácido fenólico descarboxilado que debe emplearse de acuerdo con la invención está en forma de un extracto de café que contiene el ácido fenólico descarboxilado como se ha descrito en la presente. En otra versión de la invención, el ácido fenólico descarboxilado se aísla parcial o completamente de un extracto de café de la invención. El ácido fenólico descarboxilado que debe emplearse de acuerdo con la invención, puede administrarse mediante cualquier método adecuado a un humano o animal, por ejemplo, oralmente, por vía intravenosa, o tópicamente a la piel. Si se administra oralmente, esto puede ser por ejemplo en forma de un producto alimenticio o bebida de la invención. En una versión de la invención, un producto alimenticio o bebida de la invención se vende con una etiqueta que indica su empleo de acuerdo con la invención.

En la presente se describe el empleo del ácido fenólico descarboxilado derivado del ácido clorogénico del café, para la preparación de un producto alimenticio o bebida. El producto alimenticio o bebida puede ser cualquier producto alimenticio o bebida conocido ya en la técnica. En una versión preferida, el producto alimenticio o bebida es una bebida de café; café soluble puro; un refresco, un suplemento dietético, un producto lácteo; un producto de cereales; un producto de jugo de frutas o un producto de jugo vegetal; o un producto de pastelería, como por ejemplo un producto de chocolate, por ejemplo una bebida de chocolate. Cuando el ácido fenólico descarboxilado se emplea para preparar un producto alimenticio o bebida, éste puede ser añadido en cualquier paso apropiado en el proceso de producción de dicho producto alimenticio o bebida.

Se describe en la presente el empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, como un antioxidante, por ejemplo, como un ingrediente en un producto, por ejemplo un producto alimenticio o bebida, en el cual las propiedades antioxidantes son deseadas, por ejemplo, para prevenir la oxidación de los componentes del producto durante el almacenamiento. Los antioxidantes se emplean corrientemente en un número de productos, y un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, puede emplearse de una manera similar a los antioxidantes convencionales. La persona experta en la especialidad puede determinar fácilmente la cantidad necesaria para lograr el efecto antioxidante deseado mediante una experimentación rutinaria.

En una versión, la invención se refiere al empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, para potenciar la capacidad antioxidante y/o la capacidad antiinflamatoria *in vivo* en un humano o un animal, por ejemplo, mediante la inducción de enzimas destoxicantes como por ejemplo la glutatión-S- transferasa (GST) y mediante el aumento de la vía de expresión del gen mediado por el Nrf2. El aumento de los genes asociados por la actividad del Nrf2, se ha informado que potencia la destoxicación y estimula la defensa endógena contra el estrés oxidante. Estos efectos pueden lograrse por ejemplo mediante la administración oral de los ácidos fenólicos descarboxilados o mediante la aplicación tópica sobre la piel de un humano un animal.

En otra versión, la invención se refiere al empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, para disminuir la inflamación en un humano o un animal, por ejemplo, mediante la reducción del nivel de la prostaglandina E2, por ejemplo mediante la administración oral de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, a un humano o un animal.

Muchos problemas y trastornos de salud van ligados a un estrés oxidante o a una inflamación. Un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, puede emplearse para el tratamiento o prevención de dichos problemas o trastornos. Problemas y trastornos relevantes son por ejemplo los trastornos de la piel, por ejemplo los daños causados por la radiación UV, la dermatitis atópica, el eczema, las escamas en la piel, el picor, los síntomas de alergia, los trastornos del cerebro, la inflamación, la obesidad, y el cáncer, por ejemplo, el cáncer de piel y el cáncer de pulmón.

En una versión de la invención, un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, se emplea como un agente antidiabético, por ejemplo, mediante la reducción de los niveles de glucosa en sangre, y/o aumentando los niveles de leptina, de insulina y/o c) de los péptidos en sangre; como un agente remodelador del hueso, por ejemplo aumentando la densidad mineral del hueso y/o aumentando los niveles en suero de estrógenos y/o progesterona y/o la actividad de la fosfatasa alcalina, como agentes anti-metastáticos, por ejemplo con efecto anti-angiogénico, y/o para la protección del cerebro. Estos efectos pueden lograrse por ejemplo mediante la administración oral a un humano o a un animal.

En otra versión de la invención, un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, se emplea para la preparación de una formulación para el tratamiento o prevención de la diabetes, los trastornos del cerebro, la inflamación, la obesidad, el cáncer; los trastornos neurodegenerativos, el declive cognitivo, el deterioro cognitivo leve, la demencia, los trastornos del humor, la depresión, los trastornos del sueño, una enfermedad que implica la agregación de proteínas, la enfermedad de Alzheimer (incluyendo los síntomas comunes de la AD, la demencia, el deterioro cognitivo leve y el declive cognitivo como por ejemplo, los trastornos del sueño, los cambios de humor, la depresión, el estrés), la degeneración macular,

o la diabetes. La formulación puede ser de cualquier forma que sea adecuada, por ejemplo para administración oral o para administración tópica sobre la piel, por ejemplo en forma de un producto alimenticio o bebida, un suplemento nutritivo, un comprimido, una loción, o un producto cosmético. En una versión preferida, la formulación es un medicamento.

5 La invención se refiere además al empleo no terapéutico de un producto alimenticio, de un producto de bebida, de un suplemento alimenticio o de un producto de la invención para pienso para animales domésticos, para el tratamiento y/o prevención de trastornos de la piel como por ejemplo los daños causados por la radiación UV, la dermatitis atópica, el eczema, la formación de escamas, el picor, los síntomas alérgicos; la inflamación; la obesidad; 10 el cáncer, por ejemplo el cáncer de piel y el cáncer de pulmón; el declive cognitivo, los trastornos de humor, y/o los problemas de sueño; para la protección del cerebro; y/o para aumentar el rendimiento cognitivo, la respuesta inmunológica, y/o una función barrera del intestino en un humano o un animal. El rendimiento cognitivo puede por ejemplo expresarse como la capacidad y velocidad de aprendizaje, capacidad y velocidad de resolver problemas intelectuales, capacidad para formar y recuperar memorias, tiempo de reacción, y similares. El declive cognitivo 15 puede por ejemplo manifestarse en sí mismo como la memoria reducida, el olvido, los problemas para encontrar una palabra o un nombre, el declive de la memoria, la concentración, la capacidad para planear u organizar, la capacidad para realizar tareas complejas, y/o el rendimiento cognitivo, y puede ser, por ejemplo, resultado de la edad, del estrés, de una enfermedad, u otras causas. La cognición se define como que es un proceso mental como la comprensión, la inferencia, la toma de decisiones, el planeamiento, el aprendizaje, la memoria, la asociación, la formación de conceptos, el lenguaje, la atención, la percepción, la acción, la solución de problemas e imágenes mentales. 20

En otra descripción, se describen los métodos para aumentar el rendimiento cognitivo; el tratamiento o prevención de trastornos de la piel, por ejemplo los daños causados por la radiación UV, la dermatitis atópica, el eczema, la 25 formación de escamas, el picor, los síntomas alérgicos, la inflamación; la obesidad; el cáncer, por ejemplo el cáncer de piel y el cáncer de pulmón, los trastornos neurodegenerativos, el declive cognitivo; el declive cognitivo suave, la demencia; cualquier enfermedad que implica la agregación de las proteínas; la enfermedad de Alzheimer; la degeneración macular; o la diabetes; el método comprende la administración de un producto alimenticio, de un producto de bebida, o un producto alimenticio para animales domésticos que comprende una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, a un humano o un animal. El producto alimenticio, el producto de bebida o el producto alimenticio para animales 30 domésticos puede ser administrado junto con un medicamento para aumentar la eficacia y/o reducir la dosis del medicamento.

35 Todavía en otra descripción, se describe un método para el tratamiento o prevención de trastornos de la piel, por ejemplo los daños lumínicos causados por la radiación UV, la dermatitis atópica, el eczema, la formación de escamas, el picor, los síntomas alérgicos, la inflamación; la obesidad; el cáncer, por ejemplo el cáncer de piel y el cáncer de pulmón; los trastornos neurodegenerativos; el declive cognitivo; el declive cognitivo suave; la demencia; cualquier enfermedad que implica la agregación de proteínas; la enfermedad de Alzheimer; la degeneración macular; o la diabetes; el cual comprende la administración de una cantidad efectiva de un medicamento que 40 contiene un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, a un humano o animal en necesidad de los mismos. El producto alimenticio, el producto de bebida o un producto alimenticio para animales domésticos puede ser administrado junto con un medicamento para aumentar la eficacia y/o reducir la dosis del medicamento. 45

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

50 Tratamiento del extracto de café verde, con una preparación secada por pulverización del *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225)

Se disolvieron 30 mg de un extracto de café verde seco, en 1 ml de tampón de fosfato (50 mM, pH 7,0) ó en 1 ml de agua. A esta solución se añadieron 10 mg de una preparación secada por pulverización del *Lactobacillus johnsonii* 55 (CNCM 1-1225) (3.3 E9 cfu/g). La mezcla se incubó a continuación a 37 °C y se retiraron muestras en diferentes tiempos de la reacción. Después de la centrifugación (3000 g, 5 minutos) y la filtración (poros de un tamaño de 0,45 µm de los filtros jeringa Millipore SLHA 025 BS), las muestras se analizaron mediante HPLC:

### Análisis HPLC

60 Las muestras de extracto de café se diluyeron a 1 % p/p y se analizaron mediante RP-HPLC en una columna CC 250/4 Nucleosil 100-5-C18 (Macherey-Nagel). El sistema eluyente fue el agua Millipore, 0,1 % de TFA y CH<sub>3</sub>CN a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto. El método permitió la simultánea determinación de CQA, FQA, di-CQA, ácido cafeico (CA), ácido ferúlico (FA), y 4-vinilcatecol (absorbancia a 325 nm) empleando curvas de calibración de un estándar externo. Los resultados se expresaron con respecto al tiempo 0 (10). 65

Ensayo del elemento responsable antioxidante (ARE) de la luciferasa

Se transfectó de forma estable el pGL-8xARE que contiene ocho copias del ARE presente en la rata glutatión-S-transferasa A2 (GSTA2) junto con el plásmido pcDNA3.1, conteniendo el marcador de selección de la neomicina, en células humanas MCF7 (Wang et al., Cancer Res. 66, 10983-10994, 2006). ARE (elemento responsable antioxidante) es el sitio de unión del factor de transcripción Nrf2 el cual regula los genes implicados en la detoxificación y la defensa endógena contra el estrés oxidante. El plásmido pGL-8xARE contiene un gen de la luciferasa corriente abajo de los sitios de unión ocho Nrf2, que permiten la monitorización de la actividad Nrf2. Las células AREc 32 fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pocillos en un medio de crecimiento DMEM. Después del tratamiento con 4-vinilcatecol durante 24 horas se determinó la actividad luciérnaga de la luciferasa.

Ensayo de formación de la prostaglandina E2

Las células HT-29 de colon humano, se trataron con 4-vinilcatecol durante 15 horas, seguido de una co-incubación de 6 horas junto con un agente pro-inflamatorio TNF- $\alpha$  (10 ng/mililitro). Se determinó el análisis de la producción de PGE2 en las células HT-29, empleando un inmunoensayo de enzima competitiva (EIA) (Cavin et al., BBRC 327, 742-49, 2005).

Resultados

Se observó un pico desconocido en el análisis HPLC de los extractos fermentados de café producido por la fermentación o incubación de 2 diferentes extractos de granos verdes de Robusta. El compuesto se identificó mediante una combinación de LC-MS-ToF y NMR como el 4-vinilcatecol. El extracto de café verde se trató como se ha descrito más arriba y se analizó mediante HPLC. Los resultados están mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de un extracto de café verde tratado con *Lactobacillus johnsonii* durante un tiempo especificado. Las cantidades vienen dadas como % de las cantidades en el extracto sin tratar, excepto para el 4-vinilcatecol el cual viene dado como el área de la señal de HPLC. El 4-vinilcatecol no fue detectado en el extracto sin tratar.

Tiempo (horas)	16	24
CQA	38	32
FQA	45	42
diCQA	27	20
CA	7409	549
FA	847	422
4-vinilcatecol (área del pico de la HPLC, AU)	643	2119

La inducción de la actividad del Nrf2 mediante el 4-vinilcatecol se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Inducción de la actividad del Nrf2 mediante el 4-vinilcatecol (actividad luciérnaga de la luciferasa, AU)

4-vinilcatecol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad luciérnaga de la luciferasa (AU)
200	16
400	41
600	22

La producción de PGE2 en las células HT-29 se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Producción del PGE2 en las células HT-29, respecto a la muestra de control sin tratar

4-vinilcatecol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Formación de PGE2 (% de control)
0	100
3,13	58
6,25	46
9,38	21
15,63	12
31,25	5
62,5	2

Ejemplo 2

El extracto de café verde se diluyó al 1% p/p y se analizó mediante RP-HPLC sobre una columna CC 250/4 Nucleosil 100-5-C18 (Macherey-Nagel). El sistema eluyente fue el agua Millipore, 0,1% de TFA y CH<sub>3</sub>CN a una

velocidad de flujo de 1 ml/minuto. Se detectó el 4-vinilcatecol mediante una absorbancia a 265 nanómetros. Se obtuvo una curva de calibración estándar para el 4-vinilcatecol mediante la calibración externa con 4-vinilguayacol, puesto que el 4-vinilcatecol es inestable en forma aislada. Los resultados se muestran en la tabla 4.

- 5 Tabla 4. Composición del extracto de café verde tratado con *Lactobacillus johnsonii* para un tiempo especificado. Cantidades dadas en miligramos por gramo de extracto de café seco. El 4-vinilcatecol no se detectó en el extracto sin tratar.

Tiempo (horas)	16	24
4-vinilcatecol	11	35

- 10 Ejemplo 3

#### A $\beta$ monomérico

- 15 Se purificaron péptidos monoméricos A $\beta$ 42 mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y se incubaron a 37 °C a una concentración de 10  $\mu$ M con 4-vinilcatecol, con un ratio de A $\beta$ 42 respecto al compuesto ensayado, de 1:0,5 y 1:2 (ratio molar). La extensión de la agregación se determinó a las 24 y 48 horas mediante fluorescencia con tioflavina T (ThT). De la misma manera se efectuaron controles, pero en ausencia del compuesto que se ensayaba. El ThT es un colorante hidrofóbico que presenta una fluorescencia que se potencia cuando se une a las fibrillas amiloides. El ThT se une específicamente a las fibrillas amiloides, pero no a las formas monoméricas del A $\beta$ . En este
- 20 ensayo una disminución o la ausencia de fluorescencia ThT indica que la molécula que se está ensayando reduce y/o bloquea la formación de las fibrillas amiloides. Los resultados de este ensayo están mostrados en la figura 2.

#### A $\beta$ protofibrilar

- 25 Se incubó una mezcla protofibrilar purificada mediante exclusión por tamaño de A $\beta$ 42, a 37 °C a una concentración de 10  $\mu$ M con 4-vinilcatecol, a un ratio entre el A $\beta$ 42 y el compuesto ensayado de 1:0,5 y 1:2 (ratio molar). Se determinó la extensión de la agregación a las 24 y a las 48 horas mediante fluorescencia de la Tioflavina T (ThT). Los controles se efectuaron de la misma manera excepto para la ausencia del compuesto que hay que tratar. Una
- 30 disminución o ausencia de un aumento en la señal de la fluorescencia de la ThT de las protofibrillas indicó que la molécula que debía ser tratada redujo y/o bloqueó la formación de las fibrillas del amiloide. Los resultados de este ensayo están mostrados en la figura 2.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la producción de un extracto de café, el cual comprende un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos; el método comprende:
- a) extracción de los granos de café con agua y/o vapor para producir un extracto de café ; y
  - b) tratamiento del extracto de café para hidrolizar el ácido clorogénico presente en el extracto para dar ácido fenólico, y para descarboxilar el ácido fenólico resultante.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la hidrólisis de los ácidos clorogénicos y la descarboxilación del ácido fenólico en el paso b) se efectúa mediante un microorganismo.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el microorganismo es una bacteria de ácido láctico.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde los granos de café que van a ser extraídos son granos de café verde.
5. Un extracto de café que comprende por lo menos 0,1 mg en total, del 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, y el 4-vinilveratrol, por gramo de materia seca.
- 20 6. El extracto de café de la reivindicación 5, el cual es un extracto de granos de café verde.
7. Un método para la producción de un producto alimenticio o bebida, en donde un extracto de café de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 6, se emplea como un ingrediente de dicho producto alimenticio o bebida.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en donde el producto alimenticio o bebida es una bebida de café, un café soluble puro, un refresco, un suplemento dietético, un producto lácteo, un producto de cereales, un producto de jugo de frutas o vegetales, un producto de pastelería.
- 30 9. Empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, para la preparación de un medicamento.
- 35 10. Empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, para la preparación de una formulación para el tratamiento o prevención de los trastornos del cerebro, inflamación, obesidad, cáncer, trastornos neurodegenerativos, declive cognitivo, declive cognitivo suave, demencia, trastornos del humor, depresión, trastornos del sueño, cualquier enfermedad que implica la agregación de proteínas, la enfermedad de Alzheimer, la degeneración macular, o la diabetes.
- 40 11. Empleo de la reivindicación 10, en donde dicha formulación es un producto alimenticio o una bebida.
12. Empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos para promover la remodelación del hueso.
- 45 13. Empleo de un compuesto seleccionado entre el 4-vinilcatecol, el 4-vinilguayacol, el 4-vinilveratrol, y mezclas de los mismos, para aumentar la capacidad antioxidante *in vivo* de un humano o un animal y/o para la protección del cerebro.

Figura 1

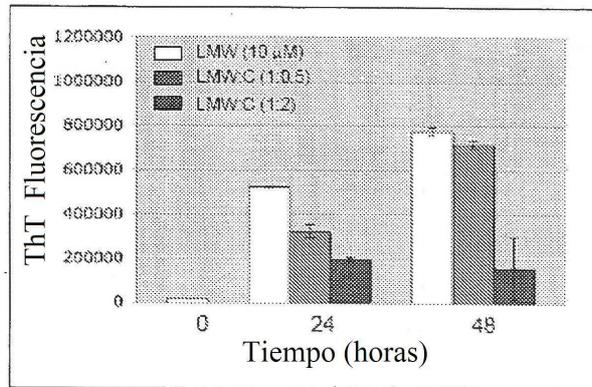


Figura 2

