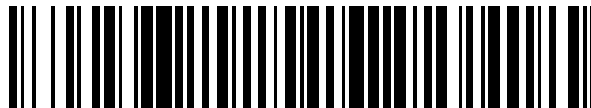


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 155**

51 Int. Cl.:

C07C 49/653 (2006.01)

A23L 1/275 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2006 E 06776855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1917227**

54 Título: **Formas de cristal de astaxantina**

30 Prioridad:

15.08.2005 EP 05017709

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

22.08.2013

73 Titular/es:

**PHARES DRUG DELIVERY AG (100.0%)
KLUENENFELDSTRASSE 30 PO BOX 637
4132 MUTTENZ, CH**

72 Inventor/es:

**LEIGH, MATHEW, LOUIS, STEVEN;
VAN HOOGEVEST, PETER y
LEIGH, STEVE**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, Jesús María

ES 2 420 155 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

Formas de cristal de astaxantina

5 La presente invención se refiere a formas de cristal que comprenden astaxantina y a procesos, composiciones y procedimientos,

10 La liberación de un colorante como la astaxantina con una buena disponibilidad oral para mejorar la captación de plasma y el depósito de carne en salmónidos es un problema de interés para los productos de alimentos para peces y para los criadores de peces. Dada la mala solubilidad en medio fisiológico, la administración de cristales de astaxantina en pastillas de alimento para peces y otras formas de dosificación nutricionales no proporcionan suficiente captación oral del colorante. Con el fin de hacer que el colorante esté más biodisponible se han desarrollado varios procedimientos para preparar composiciones en partículas de astaxantina que sean dispersables en agua para procesarlas en pastillas de alimento. Las composiciones dispersables se preparan disolviendo la astaxantina cristalina en disolventes (documentos 6.863.914 y US 6.406.735) o aceites (documento 5.364.563) a presión y temperatura altas, seguido inmediatamente de dispersión de la solución orgánica en hidrocoloide acuoso. Como alternativa, el carotenoide se funde en una matriz de excipiente acuoso y se emulsiona a presión sin usar disolvente ni aceite (documento 6,093,348). Todos los procedimientos requieren procesamiento adicional para preparar formulaciones a partir de las dispersiones acuosas. Ninguna de las divulgaciones describe el tipo de cristal de astaxantina usado en términos de su estructura cristalina, tal como se divulga mediante espectroscopia de difracción de rayos X y de Raman, A pesar de las onerosas condiciones necesarias para preparar las composiciones de astaxantina se han dirigido pocos esfuerzos para facilitar la producción de los procedimientos. Un modo de reducir la energía y el consumo de disolventes sería usar diferentes formas de cristal de astaxantina que tengan ventajas en términos de las características solubilidad, fusión o estabilidad, de modo que permitan unas condiciones de procesamiento más suaves. Sorprendentemente, en las divulgaciones se revela particularmente formas de cristales de astaxantina específicas y su posible utilidad para preparar composiciones de astaxantina. Diferentes formas de cristal pueden afectar a la tasa de disolución in vivo y permitir mayores concentraciones (supersaturadas) de carotenoides en vehículos de administración oleosos que, a su vez, proporcionan mayor captación y biodisponibilidad orales.

20 El documento 6,827,941 describe agregados amorfos de astaxantina que se preparan a partir de soluciones de astaxantina diluidas en acetona (50 mg/litro), seguidas de dilución por 20 con agua/acetona 7/3 (v/v). No habla de la formación de formas de cristal específicas. El documento US 5,654,488 describe la síntesis y cristalización de trans-astaxantina en la mezcla de reacción usando el método de Wittig, pero no especifica la estructura o estructuras de cristal que se obtienen.

30 La presente invención se refiere a una mezcla de nuevas formas de cristal, no divulgadas anteriormente, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprenden astaxantina, denominada en el presente documento Forma de cristal I y Forma de cristal II. Además, la invención describe la Forma de cristal I. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar dicha mezcla y dicha Forma de cristal I. adicionalmente, la invención describe la Forma de cristal I y combinaciones de la Forma de cristal I y la Forma de cristal II, que comprenden cantidades definidas de todo-trans-astaxantina con diferentes cantidades de (otros) compuestos carotenoides. También cubre las formas de administración que comprenden la Forma de cristal I o combinaciones de la Forma de cristal I y la Forma de cristal II y el uso de la Forma de cristal I o combinaciones de la Forma de cristal I y la Forma de cristal II disueltas o suspendidas en un disolvente oleoso u orgánico.

Las soluciones o dispersiones se pueden usar para preparar composiciones sólidas que comprenden astaxantina en vehículos de dispersión hidrófilos o lipófilos o se pueden usar para preparar formas físicas de astaxantina.

50 En la presente invención se aplican las definiciones siguientes:

“Astaxantina” comprende todo-trans-astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) junto con no más del 25 % en peso de otros compuestos carotenoides (incluidos los isómeros cis de la astaxantina).

55 “Compuestos carotenoides” incluyen metabolitos de astaxantina, derivados de astaxantina sintéticos o naturales, por ejemplo eterificados o esterificados, productos de oxidación o hidrogenación e isómeros cis. El término incluye subproductos obtenidos durante la síntesis y cristalización de astaxantina o durante el procedimiento de extracción de la astaxantina de fuentes naturales. Los compuestos carotenoides típicos relacionados con la astaxantina son, por ejemplo, 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y el aldehído C-25 (todo-trans-3-hidroxi-4-oxo-12'-apo-beta-caroten-12'-al, con N° CAS 72523-68-3). El término excluye específicamente a la todo-trans-astaxantina. El término cubre el requisito de “carotenoides totales distintos de astaxantina” de las especificaciones de la FDA de EE.UU. para astaxantina, como de describe en la norma 21 CFR 73.35.

65 “% Mol” indica la pureza de una forma de cristal con respecto al contenido molar total de carotenoides, que es la suma de todo-trans-astaxantina y compuestos carotenoides.

“sustancialmente de acuerdo” con una difracción de rayos X o espectro de Raman proporcionado en la figura significa que cualquier espectro que exhiba la misma secuencia de máximos y mínimos, que muestre la misma proporción de intensidad de dichos máximos y mínimos en el mismo número de onda (Raman) y posición del intervalo intermatricial t y d (rayos X) en una desviación típica de $\pm 5\%$ cumple los espectros de rayos X y de Raman característicos para la forma de cristal I de la astaxantina mostrados en la Fig. 1 y la Fig. 2, respectivamente.

“aproximadamente” se refiere a una desviación típica del 20 % en cualquiera de los lados de los límites en % molar de los compuestos carotenoides en la solución para preparar la Forma de cristal I o la Forma II o mezclas de las mismas o en dichas formas de cristal.

“Agente de dispersión lipófilo” es una sustancia sólida con una solubilidad en agua a una temperatura ambiente inferior o igual a 5 mg/ml, que tiene la propiedad de incorporar la dispersión molecular o coloidal o agregados de la astaxantina en una composición sólida.

“Agente de dispersión hidrófilo” es una sustancia sólida con una solubilidad en agua a una temperatura ambiente superior a 5 mg/ml, que tiene la propiedad de actuar como agente humectante para potenciar la suspensión de astaxantina en una fase acuosa. La definición también se refiere a emulsionantes aceite/agua, polímeros e hidrocoloides.

“Composición sólida” significa que la astaxantina se distribuye en una matriz sólida que se prepara disolviendo el carotenoides y el agente de dispersión lipófilo o hidrófilo juntos en un disolvente mutuo o una combinación de disolventes, seguido de la eliminación del disolvente o mezcla de disolventes.

“Disolvente miscible en agua” significa que el disolvente se puede mezclar en cualquier proporción con agua sin separación de fase, por ejemplo etanol.

“Disolvente inmiscible en agua” significa que el disolvente solo se puede mezclar parcialmente con agua con separación de fase, por ejemplo diclorometano.

“Antidisolvente” es un líquido de cristalización que es miscible con el disolvente en el que se disuelven la todo-trans-astaxantina y los compuestos carotenoides, pero que tiene una capacidad como disolvente menor o carece prácticamente de propiedades disolventes (para astaxantina) a la temperatura que produce la cristalización de la forma de cristal específica. La definición incluye agua. Por definición, la astaxantina tiene una solubilidad inferior a 1 mg/ml en el antidisolvente a la temperatura ambiente o por debajo de ella, por ejemplo metanol.

“Industrias de ciencias de la vida” incluye las industrias alimentaria, forrajera, farmacéutica, acuicultura, cosmética, nutracéutica, veterinaria.

La invención está en el área de las “formas de cristal” y “composiciones colorantes” que comprenden astaxantina natural o sintética.

La invención describe las realizaciones siguientes:

Una mezcla que consiste esencialmente en formas de cristal de astaxantina, que comprende

a) 95 % a 5 % en peso de la Forma de cristal 1 que se caracteriza por al menos uno de

i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,67 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,407 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,

ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , 82 ± 2 cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de

iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{C}$ y

iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 35-45 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$; y

b) 5 % a 95 % en peso de la Forma de cristal II que se caracteriza por al menos uno de

i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y

ES 2 420 155 T3

ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , $93 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$; y, opcionalmente, al menos uno de

iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - 240^\circ \text{ C}$ y

iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 10-30 g/l a $20^\circ \text{ C} - 25^\circ \text{ C}$;

Una realización preferida se refiere a una mezcla que consiste esencialmente en 20 % a 80 % en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I; y 80% a 20 % en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II.

Una realización preferida se refiere a una mezcla que consiste esencialmente en 10% a 90 % en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I; y 90% a 10% en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II.

Además, en el presente documento se describe una composición que comprende una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I caracterizada por al menos uno de

i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m : $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,

ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , $82 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$; y, opcionalmente, al menos uno de

iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{ C}$ y

iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 35-45 g/l a $20^\circ \text{ C} - 25^\circ \text{ C}$;

La descripción también se refiere a una composición que comprende una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II caracterizada por al menos uno de

i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m : $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y

ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , $93 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$; y, opcionalmente, al menos uno de

iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - 240^\circ \text{ C}$ y

iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 10-30 g/l a $20^\circ \text{ C} - 25^\circ \text{ C}$;

Materia objeto adicional divulgada es un procedimiento para preparar la composición mencionada anteriormente, que comprende añadir excipientes a la forma de cristal I y un procedimiento que comprende añadir excipientes a la forma de cristal II.

Una realización particularmente preferida se refiere a una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I caracterizada por al menos uno de

i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo plano intermatricial d en 10^{-10} m : $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,

ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , $82 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$; y, opcionalmente, al menos uno de

iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{ C}$ y

iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 35-45 g/l a $20^\circ \text{ C} - 25^\circ \text{ C}$;

Una realización particularmente preferida se refiere a la forma cristalina de astaxantina designada Forma de cristal I, que proporciona un patrón de difracción en polvo de rayos X sustancialmente conforme al espectro de difracción en polvo de rayos X proporcionado en la Fig. 1.

Una realización particularmente preferida se refiere a una forma cristalina de astaxantina designada Forma de cristal I, que proporciona un espectro de Raman sustancialmente conforme al espectro de Raman proporcionado en la Fig. 2.

ES 2 420 155 T3

Otra realización preferida se refiere a una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I caracterizada por al menos uno de

- 5 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,
- 10 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , 82 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- v) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{C}$; y
- 15 vi) un perfil de solubilidad en diclorometano de $35-45 \text{ g/l}$ a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$;
- Y que comprende todo-trans-astaxantina y al menos aproximadamente 15 % mol de al menos un compuesto carotenoides.

Una realización adicional se refiere a la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I caracterizada por al menos uno de

- 20 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,
- 25 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , 82 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de $35-45 \text{ g/l}$ a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$;

30 Y que comprende todo-trans-astaxantina y al menos 13 % mol de al menos un compuesto carotenoides, seleccionado del grupo que consiste en 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25. También se describe una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II caracterizada por al menos uno de

- 35 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,36 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y,
- 40 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , 93 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - 240^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de $10-30 \text{ g/l}$ a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$;

45 También se describe la forma cristalina de astaxantina designada Forma de cristal II, que proporciona un patrón de difracción en polvo de rayos X sustancialmente conforme al espectro de difracción en polvo de rayos X proporcionado en la Fig. 3.

50 También se describe una forma cristalina de astaxantina designada Forma de cristal II, que proporciona un espectro de Raman sustancialmente conforme al espectro de Raman proporcionado en la Fig. 4.

También se describe una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II caracterizada por al menos uno de

- 55 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y,
- 60 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , 93 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - 240^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de $10-30 \text{ g/l}$ a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$

y que comprende todo-trans-astaxantina y como máximo aproximadamente 7 % mol de al menos un compuesto carotenoides.

65

ES 2 420 155 T3

También se describe una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II caracterizada por al menos uno de

- 5 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y,
- 10 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , 93 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- 15 iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - -240^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 10 - 30 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$
- 15 y que comprende todo-trans-astaxantina y como máximo 7 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25.

20 También se describe una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II caracterizada por al menos uno de

- 25 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y,
- 30 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , 93 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- 35 iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - -240^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 10 - 30 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$, en el que la astaxantina cumple las especificaciones siguientes como se indica en la norma 21 CFR 73.35 de la FDA de EE.UU. mostrada en la Tabla 1:

Tabla 1

Criterios de calidad	Especificación
Estado físico	Sólido
Solución al 0,05 % en cloroformo	Completa y transparente
Máxima longitud de onda de absorción	484 – 493 nm (solución en cloroformo)
Pérdida por calcinación	No superior al 0,1 %
Contenido total de carotenoides distintos a la astaxantina	No superior al 4%
Plomo	No superior a 5 ppm
Arsénico	No superior a 2 ppm
Mercurio	No superior a 1 ppm
Metales pesados	No superior a 10 ppm
Ensayo	Mínimo 96 %

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para preparar una mezcla de formas cristalinas de astaxantina designadas Forma de cristal I y Forma de cristal II, que comprende al menos 5 % en peso/peso de la Forma I o la Forma II, que comprende las etapas de:

- 40 i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 17 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente en el que la solubilidad de la astaxantina es al menos 1 mg/ml a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que
- 45 consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico opcionalmente con un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I o II, o mezclas de las mismas, y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.
- 50

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I, que comprende las etapas de:

- 5 i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y aproximadamente 13 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 disuelto en un disolvente en el que la solubilidad de la astaxantina es al menos 1 mg/ml a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico opcionalmente con un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I o II, o mezclas de las mismas, y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.
- 10

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I, que comprende las etapas de:

15

- i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y aproximadamente 13 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, tricloroetano, cloroformo, dimetoximetano, dietoxietano, dioxaciclopentano, THF, NMP, N-etilpirrolidona, tolueno, piridina y disulfuro de carbono, a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, terc-butanol y agua, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico con la adición opcional de un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.
- 20
- 25

Además se describe un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II, que comprende las etapas de:

30

- i) disolver una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y esencialmente un máximo de aproximadamente 7 % mol a de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente en el que la solubilidad de la astaxantina es al menos 1 mg/ml a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico con la adición opcional de un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.
- 35
- 40

Además se describe un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II, que comprende las etapas de:

- 45 i) disolver la astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y esencialmente un máximo de aproximadamente 7 % mol a de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, tricloroetano, cloroformo, dimetoximetano, dietoxietano, dioxaciclopentano, THF, NMP, N-etilpirrolidona, tolueno, piridina y disulfuro de carbono y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico opcionalmente con la adición de un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal II y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.
- 50
- 55

Además se describe un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I o una mezcla de la forma de cristal I y la forma de cristal II, que comprende un proceso de cristalización que consiste en las etapas de:

- 60 i) disolver la astaxantina, que comprende todo-trans-astaxantina y como máximo aproximadamente 7 % mol a de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, tricloroetano, cloroformo, dimetoximetano, dietoxietano, dioxaciclopentano, THF, NMP, N-etilpirrolidona, tolueno, piridina y disulfuro de carbono, ii) someter la solución a al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en calor, luz, agentes oxidantes y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente
- 65

mediante evaporación u opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iiic) enfriar la solución del disolvente orgánico con o sin la adición de un agente de nucleación o semilla y iv) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.

- 5 Una realización preferida de la invención se refiere a un procedimiento que comprende procesar además formas de cristal I y II o mezclas de los mismos definidas anteriormente como formas de dosificación de nutrientes.

También se describe una forma de administración que comprende astaxantina, forma de cristal I o II, o mezclas de las mismas para usar en la industria de la ciencia de la vida.

- 10 También se describe una forma de administración que comprende astaxantina, forma de cristal I o II de astaxantina, o mezclas de las mismas, para usar en la industria de alimentos para peces en la que el contenido de astaxantina es inferior al 20 % en peso.

- 15 También se describe una forma de administración que comprende una suspensión de la forma de cristal I o II de astaxantina o mezclas de las mismas en un aceite comestible para preparar alimento para peces y para usar en la industria de la ciencia de la vida.

- 20 Otra realización de la invención es un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en alimentos para peces y en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina, o las mezclas de la forma de cristal I y II de astaxantina, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración.

- 25 También se describe un procedimiento tal para la forma de cristal II.

- Otra realización es un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en alimentos para peces y en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina, o las mezclas de la forma de cristal I y II de astaxantina, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración, que comprende un dispersante lipófilo. También se describe un procedimiento tal para la forma de cristal II.

- 30 Otra realización es un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en alimentos para peces y en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina, o las mezclas de la forma de cristal I y II de astaxantina, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración, que comprende un dispersante hidrófilo. También se describe un procedimiento tal para la forma de cristal II.

- 35 Otra realización es un procedimiento para preparar una composición oleosa que comprende astaxantina en el que el procedimiento comprende disolver la forma de cristal I, o mezclas de las formas de cristal I y II de la astaxantina directamente en un aceite comestible y/o aceite de pescado a temperaturas entre 100 °C y 230 °C para incorporación directa en pastillas de alimento para peces y otras aplicaciones. También se describe un procedimiento tal para la forma de cristal II.

45 **Breve descripción de las figuras:**

La Fig. 1 muestra un difractograma de rayos X de la forma de cristal I de astaxantina.

La Fig. 2 muestra un espectro de Raman de la forma de cristal I de astaxantina.

La Fig. 3 muestra un difractograma de rayos X de la forma de cristal II de astaxantina.

- 50 La Fig. 4 muestra un espectro de Raman de la forma de cristal II de astaxantina.

La Fig. 5 muestra un espectro de Raman de una mezcla que comprende la forma de cristal I y la forma de cristal II de astaxantina, en comparación con un espectro calculado derivado de los espectros individuales de la forma I y la forma II de cristal de astaxantina.

55 **Descripción detallada de las figuras y de los ejemplos:**

- Los carotenoides son una clase de hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantófilas) que consisten en ocho unidades isoprenoides. La clase carotenoide de compuestos se clasifica en dos grupos principales: carotenos y xantófilas. En contraste con los carotenos, que son hidrocarburos de polieno puros, tales como beta-caroteno o licopeno, las xantofilas contienen adicionalmente restos funcionales tales como grupos hidroxilo, epoxi y oxo. Representantes típicos del grupo de xantofilas son cantaxantina, zeaxantina y astaxantina.

- 65 La astaxantina es 3,3'-dihidroxi-[3,[5-caroteno-4,4'-diona. La astaxantina sintética tiene el número CAS 7542-45-2 y es una mezcla de 1:2:1 de los diaestereoisómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R). La astaxantina aislada de fuentes naturales tiene el número CAS 472-61-7. La astaxantina es un pigmento que se encuentra en muchos crustáceos, tales como la langosta común (*Homarus gammarus*), el salmón (*Salmo salar*) en las plumas de los flamencos (p.ej.,

Phoericopterus rubber). La astaxantina se usa principalmente como ingrediente del alimento para varios animales, especialmente salmón, trucha, gamba, palometa, peces decorativos y aves de corral. Recientemente, la astaxantina natural también se ha usado como aditivo alimentario, nutraceutico o cosmético con propiedades antioxidantes.

- 5 La astaxantina se puede obtener mediante fermentación (Biotechnol. Letters 10(1988)609-614), o de microalgas divulgadas en los documentos WO-A89/1997 y EP329754. El documento WO-AS6/6082 describe el aislamiento de astaxantina de fuentes naturales mediante extracción de conchas de crustáceos. El documento US2004253664 describe la producción de carotenoides, xantófilas y apocarotenoides usando microorganismos eucarióticos. Una fuente alternativa para la extracción de astaxantina natural es Aquasta™ que es un producto preparado mediante fermentación de una cepa patentada de la levadura *Phaffia rhodozyma*. Un procedimiento adicional para obtener astaxantina es usar la síntesis química, tal como en el documento US 5,654,488.

15 La detección selectiva de formas de cristal de astaxantina usando cantidades pequeñas (normalmente aproximadamente 50 μl – 1.000 μl de una solución de disolvente orgánico de astaxantina) se lleva a cabo en tubos o en placas con pocillos. La astaxantina en tubos/copas cristaliza mediante la adición de un antidisolvente o mediante evaporación y la estructura de cristal se evalúa mediante medición de sus espectro de Raman característico, patrón de difracción en polvo de rayos X y otros parámetros físicos. La cristalización controlada usando cantidades pequeñas de astaxantina que contienen esencialmente varios niveles de diferentes compuestos carotenoides tiene como resultado, inesperadamente, dos formas de cristal distintas de astaxantina que se forman individualmente o juntas en una mezcla. Las mezclas de formas de cristal se evalúan para determinar el contenido en las formas individuales comparando el espectro de Raman medido con los espectros medios individuales de las dos formas a varias proporciones en peso conocidas por el "mejor ajuste". La presencia de las dos formas individuales en la mezcla se refleja en el espectro de Raman característico, en el que no se observan picos adicionales característicos, aparte de los picos del espectro de la forma I y la forma II individual, que contribuye al espectro de "mejor ajuste". Se investigan los factores relacionados con la eliminación del disolvente y la recuperación del cristal usando disolventes polares, apolares, apróticos y próticos de relevancia industrial en términos de toxicidad (p. ej., residuos de disolventes), el grado de solubilidad y la estabilidad de la astaxantina. Muestran que la formación de la forma I o II de cristal de astaxantina es, sorprendentemente, independiente del disolvente usado o del procedimiento de cristalización, pero está dirigido esencialmente por la presencia y la concentración de los compuestos carotenoides.

20 Inesperadamente, la astaxantina puede existir en dos formas de cristal distintas y como mezcla de las dos formas, dependiendo de las condiciones para preparar los cristales. Esto indica claramente que las dos formas cristalinas industrialmente útiles y una mezcla de las dos formas se puede preparar en condiciones controladas a partir de una solución de astaxantina.

35 La técnica conocida para preparar composiciones de astaxantina para alimento para peces y aplicaciones nutricionales y otras ramas en la industria de las ciencias de la vida no divulgan la posibilidad de preparar formas de cristal específicas y, en particular, mezclas de las dos formas claramente caracterizadas mediante el patrón de difracción en rayos X y el espectro de Raman. Además de al menos otro parámetro físico tal como el punto de fusión, la solubilidad en disolventes orgánicos, barrido DSC. Las formas de cristal tienen una solubilidad diferente en disolventes orgánicos y aceites que permiten una elección más amplia para manipular y formular las composiciones de astaxantina. Además, la forma de cristal puede afectar a la tasa de disolución in vivo y permitir mayores concentraciones (supersaturadas) en vehículos de administración oleosos que, a su vez, proporcionan mayor captación y biodisponibilidad orales, tras la administración oral.

45 Los difractogramas en rayos X de las formas de cristal de astaxantina se registran usando un modelo Bruker D8 Advance. Los valores D se calculan a partir de dos valores de teta-dos a una longitud de onda de $1,5406 \cdot 10^{-10}\text{m}$. La radiación CuK alfa 2 se elimina usando el software de Bruker, EVA Versión 10.0. Los espectros de Raman se registran con un espectrómetro Bruker FT-Spectrometer Bruker RFS 100/S con una longitud de onda de excitación láser de 1064 nm. Las mediciones de DSC se realizan con un calorímetro diferencial de barrido de Perkin Elmer Modelo DSC 7.

55 La forma de cristal I tiene un hábito cristalino con forma irregular y un aspecto rojo/marrón rojizo y un punto de fusión más bajo, mayor solubilidad y tasa de disolución en disolventes orgánicos o aceites en comparación con la forma II de cristal. La forma de cristal I se caracteriza por su difracción en polvo de rayos X y su espectro de Raman, según se proporciona en las Figs. 1 y 2, respectivamente. La Tabla 2 proporciona la difracción en polvo de rayos X característica de la forma de cristal I. Las posiciones de los picos las da el ángulo teta-2 y el correspondiente valor d. La desviación típica en estas posiciones puede ser $\pm 5\%$ o menor. La intensidad de los picos la proporcionan su valor de Cps y la intensidad relativa relacionada con el máximo más alto. Cuando la intensidad relativa es $< 5\%$, el pico se designa como "vw", es decir "muy débil". De acuerdo con lo anterior, 5—15 % como "w" (débil); 15 – 30 % como "m" (medio); 30 – 70 como "s" (fuerte) y $> 70\%$ como "vs" (muy fuerte).

Tabla 2

Ángulo 2-teta°	Valor d 10 ⁻¹⁰ m	Intensidad relativa cualitativa	Intensidad en Cps	% de Intensidad
7,02	12,6	vw	5,7	3,9
11,02	8,0	s	49,7	34,2
11,71	7,6	w	20,6	14,2
12,36	7,2	w	8,41	5,8
13,70	6,5	s	74,5	51,2
14,09	6,3	s	12,8	50,1
14,44	6,1	m	35,3	24,3
14,86	6,0	s	75,9	52,2
15,88	5,6	s	84,5	58,2
16,31	5,4	vs	145	100
18,21	4,9	vs	127	87,5
18,70	4,7	w	21,7	14,9
20,53	4,3	s	90,1	62
20,94	4,2	s	44,8	30,8
21,09	4,2	s	44,9	30,9
21,84	4,1	m	32,2	22,1
22,05	4,0	s	43,6	30
23,54	3,8	w	12,3	8,5
24,82	3,6	m	24,5	16,9
25,40	3,5	m	28	19,2
26,22	3,4	w	10,9	7,5
27,67	3,2	w	8,75	6
28,79	3,1	vw	6,92	4,8
31,96	2,8	vw	6,61	4,6

La Tabla 3 proporciona el espectro Raman característico de la forma de cristal I. Las posiciones de los picos las da el número de onda en cm⁻¹. La desviación típica en estas posiciones puede ser 5 % o menor. La intensidad de los picos la proporcionan su valor de intensidad de Raman y la intensidad relativa relacionada con el máximo más alto. Cuando la intensidad relativa es < 5 %, el pico se designa como "vw", es decir "muy débil"; de acuerdo con lo anterior, 5 - 15 % como "w" (débil); 15 - 30 % como "m" (medio); 30 - 70 como "s" (fuerte) y > 70 % como "vs" (muy fuerte).

5

Tabla 3

Número de onda cm ⁻¹	Intensidad relativa cualitativa	Intensidad de la emisión de Raman	Intensidad (%)
372,8	s	0,179	35,8
347,7	m	0,122	24,4
333,3	m	0,138	27,6
312,1	s	0,184	36,8
289,9	s	0,231	46,3
234,9	m	0,13	26,1
194,4	s	0,311	62,3
178,1	s	0,326	65,3
132,8	vs	0,499	100
81,6	m	0,101	20,2

La forma de cristal I es estable en forma seca. Este cristal puede exhibir propiedades deseables sobre las de la forma II, tal como una mayor solubilidad en disolventes orgánicos y aceites.

15 La forma de cristal II tiene un hábito cristalino de tipo cuchilla/laminar y un aspecto azul/violeta y un punto de fusión más alto y una solubilidad menor en aceite y disolventes orgánicos en comparación con la forma de cristal I. La forma de cristal II se caracteriza por su difracción en polvo de rayos X y el espectro de Raman como se indica en las Figs. 3 y 4, respectivamente. En la tabla 4 se proporciona la difracción en polvo de rayos X típica de una forma de cristal II. Las posiciones de los picos las da el ángulo 2-teta° y el correspondiente valor d. La desviación típica en estas posiciones puede ser ±5 % o menor. La intensidad de los picos la proporcionan su valor de Cps y la intensidad relativa relacionada con el máximo más alto. Cuando la intensidad relativa es < 5 %, el pico se designa como "vw",

20

ES 2 420 155 T3

es decir "muy débil"; de acuerdo con lo anterior, 5 - 15 % como "w" (débil); 15 - 30 % como "m" (medio); 30 - 70 como "s" (fuerte) y > 70 % como "vs" (muy fuerte).

Tabla 4

Ángulo 2-teta ^o	Valor 10 ⁻¹⁰ m	Intensidad relativa cualitativa	Intensidad en Cps	% de Intensidad
8,37	10,6	w	12,1	5,0
9,82	9,0	vw	9,0	3,7
10,26	8,6	w	18,6	7,7
12,32	7,2	m	66,1	27,3
13,49	6,6	s	118,0	48,8
13,69	6,5	s	129,0	53,1
16,15	5,5	s	77,8	32,1
16,58	5,3	s	99,2	40,9
16,81	5,3	m	41,9	17,3
18,82	4,7	w	36,0	14,8
19,76	4,5	m	38,0	15,7
20,27	4,4	vs	242,0	100
20,62	4,3	w	23,1	9,5
21,53	4,1	s	82,7	34,1
22,10	4,0	w	22,0	9,1
22,86	3,9	m	51,9	21,4
23,54	3,8	w	21,3	8,8
23,83	3,7	w	17,1	7,1
24,63	3,6	m	55,3	22,8
25,00	3,6	s	148,0	61,3
25,53	3,5	w	31,8	13,1
25,87	3,4	w	21,5	8,9
26,64	3,3	m	41,4	17,1
26,80	3,3	m	48,7	20,1
27,65	3,2	s	75,8	31,3
29,24	3,1	w	12,8	5,3
29,92	3,0	w	14,8	6,1
31,79	2,8	w	20,3	8,4
32,38	2,8	w	27,9	11,5
32,58	2,8	w	25,3	10,4
34,88	2,6	w	30,9	12,8

5 En la Tabla 5 se proporciona un espectro de Raman típico para la forma II de cristal. Las posiciones de los picos la proporciona el número de onda en cm⁻¹. La desviación típica en estas posiciones puede ser ± 5 % o menor. La intensidad de los picos la proporcionan su valor de intensidad de Raman y la intensidad relativa relacionada con el máximo más alto. Cuando la intensidad relativa es < 5 %, el pico se designa como "vw" (muy débil); de acuerdo con lo anterior, 5 - 15 % como "w" (débil); 15 - 30 % como "m" (medio); 30 - 70 como "s" (fuerte) y > 70 % como "vs" (muy fuerte).

Tabla 5

Número de onda cm ⁻¹	Intensidad relativa cualitativa	Intensidad de la emisión de Raman	Intensidad (%)
376,7	s	0,267	65,9
338,1	m	0,110	27,1
314,0	s	0,151	37,2
306,0	s	0,214	52,8
290,9	s	0,230	56,8
207,0	vs	0,405	100
180,0	s	0,249	61,5
138,8	s	0,361	89,1
107,7	s	0,279	68,9
93,3	s	0,238	58,7

La Fig. 5 muestra un espectro de Raman de una mezcla que comprende la forma de cristal I y la forma de cristal II en una proporción en peso de 0,55:0,45.

5 Para preparar la forma de cristal deseada o las mezclas de las dos formas, la astaxantina que comprende al menos 93 % en peso de todo-trans-astaxantina se puede disolver en un disolvente adecuado y usar como material de partida. Se pueden añadir cantidades adecuadas de al menos un compuesto carotenoideo. Como alternativa, el o los compuestos carotenoideos se pueden formar in situ controlando las condiciones de, por ejemplo, temperatura y oxidación de la solución precedente y/o durante la cristalización. Por ejemplo, los compuestos carotenoideos se pueden formar in situ durante o después de la disolución de astaxantina en disolventes de punto de ebullición altos, tales como tolueno, aceites comestibles y alcanoles. Las semillas que comprenden la forma de cristal deseada pueden añadirse al medio de cristalización para acelerar la cristalización e incrementar el rendimiento de la forma de cristal deseada.

10 Como alternativa, la forma de cristal deseada o mezcla de la forma I y la forma II se puede preparar controlando el procedimiento mediante las etapas de fabricación, extracción o purificación para astaxantina, en el que la solución de cristalización final comprende una cantidad suficiente de al menos un compuesto/s carotenoideos esencialmente dentro del intervalo deseado para formar la forma de cristal I, la forma II o mezclas físicas de la forma I y la forma II como se ha descrito en esta memoria. La forma de cristal I, o mezclas de la forma I y la forma II, también se pueden preparar a partir de una solución con astaxantina muy pura (es decir, más del 95 %), seguido del tratamiento de la solución con, por ejemplo, calor y/o luz para producir la formación de una cantidad suficiente de compuesto carotenoideo para obtener esencialmente la forma de cristal I, o mezclas de la forma I y la forma II, tras la cristalización final.

15 Debe entenderse que los procedimientos de cristalización mencionados anteriormente se pueden llevar a cabo en las etapas de purificación o extracción de cristales de astaxantina (como parte de la síntesis química o aislamiento del compuesto de astaxantina de productos naturales), en el que se usa al menos una etapa de cristalización para preparar cristal de astaxantina o un procedimiento de (re)cristalización usando disolventes.

20 Las soluciones de partida para preparar la forma de cristal de astaxantina o mezcla de las formas de cristal no tienen que contener la cantidad exacta de compuestos carotenoideos (dentro del intervalo deseado de una forma de cristal concreta), siempre que haya una concentración suficiente al principio de la cristalización, junto con cristales de forma I o II o mezclas de las mismas, según se ha divulgado. La disolución de la astaxantina en disolventes en ebullición puede dar como resultado una formación suficiente de compuestos carotenoideos como subproductos. Además, seleccionando el disolvente, la temperatura y las condiciones de lavado más adecuadas, se puede eliminar los compuestos carotenoideos no asociados. La adición de semillas que comprenden la forma de cristal I o la forma de cristal II a una solución de cristalización puede también acelerar la formación de la forma deseada con rendimientos más altos.

25 Compuestos carotenoideos adecuados que se pueden añadir a la todo-trans-astaxantina, de forma individual o, preferentemente, como una mezcla para preparar la forma de cristal I de la astaxantina, o la II, o una mezcla de las mismas, son derivados sintéticos de astaxantina, por ejemplo productos eterificados o esterificados, oxidación o hidrogenación, cis-isómeros de astaxantina. El término incluye subproductos obtenidos durante la síntesis y cristalización de astaxantina o durante el procedimiento de extracción de la astaxantina de fuentes naturales. La formación de los compuestos carotenoideos puede ser el resultado de realizar la síntesis en condiciones subóptimas o puede ser el resultado de realizar los procedimientos de síntesis, extracción o cristalización en condiciones que permitan el control de la concentración del compuesto carotenoideo al nivel deseado. Uno de una mezcla de los compuestos carotenoideos preferidos se puede seleccionar de miembros del grupo de compuestos carotenoideos que consisten en 9-cis, 13-cis-astaxantina y otros derivados de cis-astaxantina (p. ej., 15-cis-astaxantina), astaceno (es decir, $\beta\beta$ -caroteno-3,3',4,4'-tetrona con N^o CAS 514-76-1), semiastaceno (3-hidroxi- $\beta\beta$ -caroteno-3',4,4'-tetrona) y el aldehído C-25 (todo-trans-3-hidroxi-4-oxo-12'-apo-beta-caroten-12'-al, con n^o CAS 72523-68-3). Se pueden usar solos o en cualquier combinación.

30 Existen varios procedimientos de cristalización en base a principios similares que se pueden considerar para preparar la forma de cristal I, la forma II o mezclas que comprenden la forma I y la forma II, a partir de soluciones que difieren en el perfil y la concentración del compuesto carotenoideo. Entre los procedimientos de cristalización adecuados que pueden considerar los expertos en la técnica se incluyen los procedimientos siguientes. En general, los disolventes adecuados para preparar las soluciones son disolventes que disuelven al menos 1 mg/ml, preferentemente hasta 10-50 mg/ml de astaxantina a la temperatura a la que se inicia la cristalización. Cuando se usan antidisolventes, los antidisolventes adecuados son disolventes que disuelven menos de 1 mg/ml a la temperatura para la cristalización y que son miscibles con el disolvente en el que se disuelve la astaxantina.

35 A partir de una solución orgánica apolar aprótica de astaxantina en condiciones de temperatura controlada, la cristalización se induce mediante eliminación del disolvente desde la solución, opcionalmente mediante intercambio simultáneo con un antidisolvente polar miscible. Un disolvente aprótico apolar preferido es diclorometano. Disolventes apróticos apolares clorados alternativos son, por ejemplo, cloroformo, tricloroetano. Alternativas no

cloradas adecuadas son dimetoximetano, dietoxietano y dioxaciclopentano A. Un antidisolvente polar preferido es metanol u otros alcoholes tales como etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y terc-butanol.

5 Los cristales que comprenden la forma I o II también se pueden obtener mediante eliminación del disolvente a partir de una solución de astaxantina en un disolvente aprótico polar o prótico polar mediante evaporación. Se prefieren los disolventes que tienen una solubilidad alta para astaxantina y un punto de ebullición bajo. Ejemplos son THF y piridina.

10 Otro procedimiento para inducir la cristalización es enfriar una solución (sobre)saturada en un disolvente aprótico apolar. Disolventes apróticos apolares preferidos son diclorometano, tolueno o disolventes apróticos apolares clorados alternativos. También se pueden considerar los disolventes polares tales como tetrahidrofurano (THF), N-metilpirrolidona ((NMP), N-etilpirrolidona (NEP) y piridina que tienen una solubilidad elevada para astaxantina. La tasa de cristalización y el rendimiento de la forma de cristal deseada se pueden aumentar añadiendo semillas de la forma pura a la solución de cristalización.

15 Los cristales que comprenden la forma I o II también se pueden obtener mediante dilución de una solución de astaxantina que contiene las concentraciones deseadas de todo-trans-astaxantina y compuestos carotenoides en un disolvente aprótico apolar, aprótico polar o prótico polar añadiendo un antidisolvente polar miscible. Ejemplos de disolventes apróticos apolares son diclorometano, tolueno o disolventes clorados alternativos. Los antidisolventes son, en ese caso, alcoholes como metanol. Ejemplos de disolventes polares adecuados son THF, NMP y piridina. Como antidisolvente se pueden usar alcoholes o, preferentemente, agua.

20 Los cristales resultantes se recogen mediante, por ejemplo, filtración, sedimentación espontánea o procedimientos de centrifugación conocidos en la técnica, se lavan opcionalmente con un (anti)disolvente adecuado, preferentemente con un alcohol frío (preferentemente metanol) y se secan, preferentemente al vacío. Los cristales resultantes se pueden moler para obtener el tamaño de partícula deseado para su posterior procesamiento.

25 Usando los procedimientos descritos anteriormente, los disolventes clorados se pueden sustituir con dimetoximetano, dietoxietano o dioxaciclopentano.

30 Dado que la concentración del compuesto carotenoides en la solución de cristalización aumenta de 0 % hasta aproximadamente 7 % mol y los carotenoides restantes son todo-trans-astaxantina, se forma predominantemente la forma de cristal II y la presencia de la otra forma de cristal I puede estar por debajo de niveles detectables de menos del 5 %. A aproximadamente el nivel de compuesto carotenoides de 7 % mol y los carotenoides restantes son todo-trans-astaxantina se pueden formar cantidades minoritarias de la forma de cristal I en presencia de cantidades mayoritarias de la forma de cristal II. Cuando el % mol de los compuestos carotenoides presentes en la solución aumenta desde aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 17 % mol y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina se obtienen mezclas que comprenden la forma de cristal I y II, en las que la proporción entre la forma I y la II sigue al incremento de los compuestos carotenoides. A aproximadamente un nivel del 17 % mol del compuesto carotenoides y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina se pueden formar cantidades minoritarias de la forma de cristal II en presencia de cantidades mayoritarias de la forma de cristal I. Por encima de aproximadamente el 17 % mol de los compuestos carotenoides y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina, la forma I predomina y la presencia de la forma de cristal II puede estar por debajo de niveles detectables de menos del 5 %. No obstante, la extensión de la formación de la forma de cristal I y/o II depende de las condiciones globales de cristalización.

40 En función del nivel de carotenos en la solución de cristalización y mezclas de condiciones de cristalización de la forma de cristal I y II pueden contener de 0 % a 100 % de la forma I y de 100 % a 0 % de la forma II o de 0,1 % a 99,9 % de la forma I y de 99,9 % a 0,1 % de la forma II, o de 5 % a 95 % de la forma I y de 95 % a 5 % de la forma II, o de 10 % a 90 % de la forma I y de 90 % a 10 % de la forma II o de 20 % a 80 % de la forma I y de 80 % a 20 % de la forma II.

45 En ejemplos preferidos en los que los compuestos carotenoides son, predominantemente, cis-astaxantina se pueden formar cristales de forma I que contienen al menos aproximadamente 17 % mol de cis-astaxantina (preferentemente 9-cis o 13-cis o mezclas de los mismos). Por tanto, es posible preparar la forma de cristal I de astaxantina que comprende hasta casi el 100 % de astaxantina, que tiene características de solubilidad beneficiosas en disolventes orgánicos y aceites y un punto de fusión menor.

50 El contenido de compuestos carotenoides puede ser más alto o más bajo en la solución de partida en comparación con los cristales resultantes en función del procedimiento de cristalización aplicado. Cuando se usan temperaturas mayores, aumentaría la concentración del compuesto carotenoides en la solución y los cristales, mientras que disminuiría el contenido en todo-trans-astaxantina de los cristales. Cuando se usan condiciones de temperatura más leves y/o diferentes procedimientos de cristalización, el nivel de compuesto carotenoides puede ser menor en los cristales. En paralelo, el contenido en todo-trans-astaxantina de los cristales aumentaría. Además, la etapa de lavado usada en la etapa final para preparar la forma de cristal de astaxantina deseada puede eliminar los compuestos carotenoides no asociados de los cristales de astaxantina.

La forma de cristal I, preparada a partir de soluciones que comprenden todo-trans-astaxantina y más de aproximadamente 17 % mol de compuesto(s) carotenoides, pueden comprender todo-trans-astaxantina junto con al menos aproximadamente 13 % mol de, preferentemente, al menos un miembro del grupo de compuestos carotenoides que consisten en cis-astaxantina, semiastaceno, astaceno o aldehído C-25. Más preferido es 9-cis o 13-cis-astaxantina o 15-cis-astaxantina solas o en una mezcla. Cuando todos los cristales son de la forma I y la astaxantina comprende todo-trans-astaxantina y solo 9-cis o 13-cis-astaxantina, de acuerdo con la definición de pureza adoptada en acuicultura (Determination of stabilized astaxanthin in premixes and fish feeds- versión 1.1, Roche Vitamins Ltd y las referencias que contiene, J. Schierle, N. Faccin, V. Riegert), se puede considerar que la astaxantina tiene una pureza del 100 %.

La forma de cristal II, preparada a partir de una solución que comprenden todo-trans-astaxantina y una concentración de un compuesto(carotenoideo de 0 % hasta un máximo de aproximadamente 7 % mol, puede comprender todo-trans-astaxantina con menos de aproximadamente 7 % mol de, preferentemente, al menos un miembro del grupo de compuestos carotenoides que consiste en 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, semiastaceno, astaceno o aldehído C-25, más preferidos son la 9-cis-astaxantina o la 13-cis-astaxantina solas o en una mezcla. La astaxantina que cumple las especificaciones descritas en la base de datos de la FDS de EE.UU., según la norma 21 CFR 73.35, que comprende no más del 4 % de "carotenoides totales distintos a astaxantina" y en forma de la forma de cristal II está cubierta por la presente invención. Para evitar dudas, los "carotenoides totales distintos a astaxantina" se definen en la presente invención como "compuestos carotenoides". Se prefiere la astaxantina que cumple la especificación de la FDA, en la que los "carotenoides totales distintos a astaxantina" consisten en compuestos carotenoides seleccionados del grupo que consiste en al menos uno cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25. Más referida es una astaxantina que cumple la especificación de la FDA, en la que los "carotenoides totales distintos a astaxantina" consisten en compuestos carotenoides seleccionados del grupo que consiste en 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina y 15-cis-astaxantina.

Las formas de cristal pueden contener otros compuestos tales como residuos de disolventes, metales pesados y productos de degradación que están presentes en cantidades minoritarias permitidas.

La forma de cristal I y mezclas de las dos formas son adecuadas para incorporar como tales en formulaciones sólidas, semisólidas adecuadas para administrar a un organismo. Ejemplo de formas sólidas son comprimidos, granulados, pastillas, cápsulas, polvos etc. Ejemplos de formas semisólidas son cremas, pomadas, geles, suspensiones y lociones. Particularmente incluyen suspensiones micronizadas particuladas de la forma de cristal I o la forma II o mezclas de la forma I y la forma II en un vehículo oleoso. Preferentemente, los cristales están en el intervalo de tamaño medio entre 1 – 5 μm .

Las formas de administración preferidas que se pueden preparar usando la forma de cristal I son las composiciones dispersables en aceite que comprenden astaxantina y procedimientos de preparación de la misma, descritos en el documento WO03/102116. La forma de cristal I o II o mezclas de las mismas designadas mediante espectrometría de rayos X y de Raman como se ha descrito en el presente documento también se pueden usar para preparar las composiciones dispersables en agua que comprenden astaxantina que se describen en los documentos US 2,861,891, US 5,364,563 y US 15 6,296,877.

El procedimiento habitual para preparar composiciones sólidas y formulaciones que comprenden astaxantina es disolver la forma de cristal I, la forma II o mezclas de las mismas en un disolvente orgánico, miscible en agua o inmisible en agua o mezclas de los mismos en presencia de excipientes adecuados, seguido de la eliminación del disolvente mediante dilución en agua o técnicas de evaporación descritas en el documento WO03/102116. Las formas de cristal I o II pueden usarse directamente como tales y disolverse en soluciones oleosas de astaxantina aplicando energía.

Los disolventes usados para preparar soluciones y para procesar las formas de cristal I o II o mezclas de las mismas en composiciones de astaxantina seca pueden ser miscibles en agua o inmiscibles en agua. Ejemplos de disolventes miscibles en agua e inmiscibles en agua incluyen los ejemplos de disolventes usados para la cristalización de las formas de cristal que se han indicado anteriormente. Mediante la aplicación de calor/presión se puede usar un antidisolvente empleado durante la cristalización a presiones y temperaturas ambientes normales como disolvente para astaxantina (p. ej., isopropanol/agua).

Ejemplos preferidos de excipientes son dispersantes, polímeros y gomas naturales sintéticas y derivados de celulosa que pueden ser hidrófilos o lipófilos.

La composición de astaxantina sólida comprende entre 2,5 % en peso a 25 % en peso, preferentemente de 5 % en peso a 15 % en peso, más preferentemente de 7,5 % en peso a 12,5 % en peso de la astaxantina total. La cantidad de dispersante usada en la composición es, preferentemente, entre 50 % en peso y 97,5 % en peso. Se pueden usar varias cantidades de excipientes como agentes volumétrico para llegar al peso requerido.

Agentes dispersantes lipófilos adecuados son los descritos en el documento WO 03/102116 como polímeros lipófilos adecuados para preparar composiciones carotenoides solubles en aceite y usados como nutrientes o como aditivos

farmacéuticos como material de recubrimiento lipófilo para modificar la liberación del fármaco desde formas de dosificación sólidas orales. Los agentes dispersantes adecuados se pueden seleccionar de miembros concretos del grupo que consiste en etilcelulosas, resinas sintéticas y naturales, rosinas y gomas.

- 5 Dispersantes hidrófilos adecuados son los descritos en los documentos US 2861891, US 5364563 and US 6296877 como dispersantes solubles en agua y procedimientos que son adecuados para preparar composiciones carotenoides dispersables en agua. Los dispersantes hidrófilos incluyen, entre otros, coloides protectores de componentes de peso molecular bajo y alto de, por ejemplo, gelatina, gelatina de pez, almidón, dextrina, proteínas vegetales, pectina, goma arábiga, caseína, caseinato o mezclas de estos, prefiriéndose los coloides protectores que
- 10 contienen proteína, en concreto hidrolizados proteicos no gelificantes de bajo peso molecular y gelatinas de peso molecular más alto. También se pueden usar estos y otros poli(vinilalcohol), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y alginatos. El peso molecular medio del componente coloideo protector de bajo peso molecular es, preferentemente de 10.000 a 50.000, en particular de 15.000 a 30.000, mientras que el componente de alto peso molecular tiene un peso molecular medio de, preferentemente, más de 60.000. La
- 15 proporción del componente coloideo protector de bajo peso molecular es de 5 a 95 % en peso, preferentemente de 20 a 80 % en peso, en particular de 30 a 60 % en peso. Para aumentar la estabilidad mecánica del producto final, es necesario mezclar el coloide con un ablandador, tal como azúcares o alcoholes de azúcar, por ejemplo sacarosa, glucosa, lactosa, azúcar invertido, sorbitol, manitol o glicerol, como se ha descrito en el documento US 6,296,877. Dispersantes hidrófilos adicionales se pueden seleccionar de miembros del grupo que consiste en PEG
- 20 (polietilenglicol) con un PM de 4.000-6.000, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, crospovidona, copolímero de polivinilpirrolidona-polivinilacetato, hidroxipropilmetilcelulosa (HM-PC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa ftalato (HPMCP), poliacrilatos y polimetacrilatos.

El disolvente o mezcla de disolventes se elimina mediante, por ejemplo, secado por pulverización, liofilización, granulación por pulverización o expansión de fluido supercrítico.

Las formas de cristal son adecuadas para preparar composiciones que comprenden agregados J o H de astaxantina como se describe en el documento US 6,827,941, que se precipitan añadiendo la solución del disolvente orgánico preparada a partir de la forma de cristal I de astaxantina, la forma II o mezclas de los mismos hasta exceso de agua.

La forma de cristal I se puede usar, preferentemente, para fabricar las composiciones dispersables en agua de acuerdo con el documento US 6,093,348, en el que el carotenoide se dispersa con tensioactivos/hidrocoloides adecuados y se funde a temperaturas y presiones elevadas para formar una emulsión.

35 Ejemplos:

Los siguientes ejemplos representativos (1-7) ilustran procedimientos para preparar la forma de cristal I o la forma II o mezclas definidas de las mismas a partir de soluciones líquidas orgánicas con polaridades diferentes, que comprenden cantidades conocidas de todo-trans-astaxantina y al menos un compuesto carotenoideo especificado.

40 Los Ejemplos (7-9) ilustran el procedimiento en el que la forma de cristal I y/o la forma de cristal II o mezclas definidas de las mismas se pueden incorporar como tales en formas de administración. Los Ejemplos (10-13) ilustran el procedimiento en el que la forma de cristal I y/o la forma de cristal II o mezclas definidas de las mismas se pueden disolver en disolventes para preparar composiciones de administración y nutricionales.

45 Para preparar la forma de cristal deseada se adquirió astaxantina en Sigma (astaxantina natural) y del Dr. Ehrenstorfer (astaxantina sintética de calidad analítica). La pureza del compuesto se determinó mediante mediciones con HPLC y se caracterizó mediante difracción de rayos X y espectroscopia de Raman. La astaxantina ultrapura también se puede obtener a partir de astaxantina menos pura por medio de HPLC preparativa.

50 Ejemplo 1

40 mg de astaxantina (97,2 % mol de todo-trans-astaxantina y 1,6 % mol de 9-cis-astaxantina y 1,2 % mol de 13-cis-astaxantina) se disuelven en 2 ml de diclorometano (DCM) a 30 °C y se procesan en cristales mediante eliminación del disolvente al vacío. El espectro de Raman muestra la presencia de la forma de cristal II como en la Fig. 4. El patrón de difracción en rayos X se muestra en la Fig. 3. El análisis HPLC de los cristales muestra un 99,2 % mol de todo-trans-astaxantina, 0,4 % mol de 9-cis-astaxantina, 0,4 % mol de 13-cis-astaxantina, correspondiente con un nivel de compuesto carotenoideo de aproximadamente 0,8 % mol.

60 Ejemplo 2

20 mg de astaxantina de calidad analítica (97,2 % mol de todo-trans-astaxantina y 1,6 % mol de 9-cis-astaxantina y 1,2 % mol de 13-cis-astaxantina) se disuelven en 1 ml de piridina y se calientan a 70 °C durante 30 minutos. Tras la adición de 8,0 ml de agua fría, los cristales formados se lavan con agua y el espectro de Raman muestra la presencia de la forma de cristal I como se ve en el espectro de la Fig. 2. El patrón de difracción de rayos X se muestra en la Fig. 1. La determinación mediante HPLC confirma que la cantidad total de todo-trans-astaxantina y de los isómeros cis-astaxantina es de 100 %. La astaxantina comprende 78 % mol de todo-trans-astaxantina, 3 % mol

de 9-cis-astaxantina y 19 % mol de 13-cis-astaxantina. El nivel de productos carotenoides es de aproximadamente 22 % mol.

- 5 De un modo similar, cuando la solución de piridina se calienta a 80 °C durante 40 minutos, se forman 28 % mol de 13-cis-astaxantina y mediante el patrón de difracción en rayos x característico y espectro de Raman se asigna al cristal resultante la forma de cristal I de astaxantina.

Ejemplo 3

- 10 20 mg de astaxantina que comprenden 97,2 % mol de todo-trans-astaxantina y 2,8 % mol de cis-astaxantina (que además comprende 1,6 % mol de 9-cis-astaxantina y 1,2 % mol de 13-cis-astaxantina) se disuelven en 1,0 ml de piridina a temperatura ambiente (solución 1). 20 mg de la astaxantina del Ejemplo 2 que comprenden 72 % mol de todo-trans-astaxantina y 28 % mol de 13-cis-astaxantina, se disuelven en 1,0 ml de piridina a temperatura ambiente (solución 2). Las dos soluciones se mezclan en varias proporciones y se añaden 0,6 ml de agua fría, los cristales formados se recogen mediante filtración, se lavan con 2 ml de agua y se registra el espectro de Raman después de secar. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Preparación de la solución de cristalización		Nivel de compuesto carotenoides en la solución de cristalización (% mol)	Formas de cristal	
Volumen de la solución 1 (µl)	Volumen de la solución 2 (µl)		I	II
200	0	3,00	0,0	1,0
200	5	3,61	0,0	1,0
200	10	4,19	0,0	1,0
200	20	5,27	0,43	0,57
200	50	8,00	0,55	0,45
200	100	11,33	0,7	0,3
200	200	15,50	1,0	0,0
60	200	22,23	1,0	0,0
20	200	25,77	1,0	0,0
0	200	28,00	1,0	0,0

- 20 El Ejemplo 3 muestra claramente que usando un disolvente prótico polar, por ejemplo piridina, la formación de la forma de cristal I o II o mezclas de las mismas depende principalmente del nivel de compuestos carotenoides en la solución. La Fig. 5 muestra un espectro de Raman de una mezcla que comprende la forma de cristal I y la forma II en una proporción en peso de 0,55:0,45, 0,45.
- 25 Como alternativa, la concentración de compuestos carotenoides se puede controlar mediante, por ejemplo, adición de cantidades conocidas de un compuesto carotenoides suficiente para asociar con la matriz cristalina de todo-trans-astaxantina y/o formarse in situ calentando la solución de piridina lo que produce la formación de dicho compuesto carotenoides como se muestra en el Ejemplo 2 antes de añadir el agua con antidisolvente. Como alternativa, la forma de cristal deseada o la mezcla se pueden preparar mediante evaporación de la solución, enfriando la solución usando o no semillas de cualquiera de las formas de cristal I o II.

Ejemplo 4

- 35 35,66 mg de astaxantina que comprenden 97,2 % mol de todo-trans-astaxantina, 1,6 % mol de 9-cis-astaxantina y 1,2 % mol de 13-cis-astaxantina y 3,61 mg de un compuesto carotenoides que comprende astaceno se disuelven en 24 ml de DCM y el DCM se elimina mediante destilación y se sustituye simultáneamente con metanol. Los cristales formados se recogen y se lavan con metanol seco y se seca al vacío. El espectro de Raman muestra la presencia de cristales que comprenden la forma de cristal I así como la forma de cristal II en una proporción de 6:4 (los espectros de Raman de formas de cristal puro se promedian en varias proporciones en peso y de acuerdo con el espectro medido). El análisis HPLC de los cristales muestran 85,4 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina, 0,4 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina, 1,0 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina, 7,6 % en peso/peso de astaceno, 1,9 % en peso/peso de semiastaceno y 3,6 % en peso/peso de aldehído C-25 correspondiente a un nivel de compuesto carotenoides de aproximadamente 17 % mol.

Ejemplo 5

45 40,3 mg de astaxantina que comprenden 80 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina, 2,7 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina, 2,7 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina, 0,8 % en peso/peso de astaceno, 5,5 % en peso/peso de semiastaceno y 8,7 % en peso/peso de aldehído C-25 se disuelven en 24 ml de DCM y se calientan hasta ebullición.

Gota a gota se añaden 40 ml de MeOH a medida que se elimina el DCM mediante destilación. Los cristales resultantes se filtran y después se lavan con MeOH a 0 °C y los cristales se secan al vacío durante la noche a temperatura ambiente. El espectro de Raman muestra la presencia de cristales de forma I. El análisis HPLC de los cristales muestran 87 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina, 1,3 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina, 1,5 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina, 0,9 % en peso/peso de astaceno, 6,2 % en peso/peso de semiastaceno y 2,8 % en peso/peso de aldehído C-25 correspondiente a un nivel de compuesto carotenoideo de aproximadamente 16 % mol.

Ejemplo 6

196,7 mg de astaxantina que comprenden 80 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina, 2,7 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina, 2,7 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina, 0,8 % en peso/peso de astaceno, 5,5 % en peso/peso de semiastaceno y 8,7 % en peso/peso de aldehído C-25 y 203,3 mg de astaxantina, 97,2 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina, 1,6 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina y 1,2 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina se disuelven en 24 ml de DCM. El DCM se elimina mediante destilación y se sustituye simultáneamente por 40 ml de Me OH como en el Ejemplo 1. El espectro de Raman muestra la presencia de cristales que comprenden la forma de cristal I así como la forma II en la proporción de 7:3. El análisis HPLC de los cristales muestra 91 % en peso/peso de todo-trans-astaxantina y compuestos carotenoides que comprenden 0,9 % en peso/peso de 9-cis-astaxantina, 0,5 % en peso/peso de 13-cis-astaxantina, 0,4 % en peso/peso de astaceno, 3,5 % en peso/peso de semiastaceno y 3,5 % de aldehído C-25 correspondiente a un nivel de compuesto carotenoideo de aproximadamente 12 % mol.

Ejemplo 7

De forma análoga a los ejemplos precedentes se pueden usar disolventes de partida alternativos en lugar de piridina, como cloroformo, tricloroetano, dimetoximetano, dietoxietano y dioxaciclopentano THF, NMP, NEP y tolueno. Los cristales de la forma de cristal I o la forma de cristal II se pueden obtener, dependiendo de la concentración de compuesto carotenoideo en la solución de cristalización (al principio de la cristalización) que comprende todo-trans-astaxantina, a partir de la solución calentada opcionalmente mediante i) eliminación del disolvente mediante evaporación, opcionalmente con sustitución simultánea con un antidisolvente miscible ii) adición de un antidisolvente miscible a la solución o iii) enfriar una solución (sobresaturada). Dado que la concentración del compuesto carotenoideo en la solución de cristalización aumenta de 0 % hasta aproximadamente 7 % mol y la fracción restante de carotenoides totales es todo-trans-astaxantina, se forma predominantemente la forma de cristal II y la presencia de la otra forma de cristal I puede estar por debajo de niveles detectables de menos del 5 %. A aproximadamente el nivel de compuesto carotenoideo de 7 % mol y la fracción restante de carotenoides totales es todo-trans-astaxantina se pueden formar cantidades minoritarias de la forma de cristal I en presencia de cantidades mayoritarias de la forma de cristal II. Cuando el % mol de los compuesto(s) carotenoideo(s) presentes aumenta desde aproximadamente 7 % mol a aproximadamente 17 % mol y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina se obtienen mezclas que comprenden la forma de cristal I y II, en las que la proporción entre la forma I y la II aumenta. A aproximadamente un nivel del 17 % mol del compuesto carotenoideo y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina se pueden formar cantidades minoritarias de la forma de cristal II en presencia de cantidades mayoritarias de la forma de cristal I. Por encima de aproximadamente el 17 % mol del o los compuesto(s) carotenoideo(s) y la fracción restante de los carotenoides totales es todo-trans-astaxantina, la forma de cristal I predomina y la presencia de la otra forma de cristal II puede estar por debajo de niveles detectables de menos del 5 %. No obstante, la extensión de la formación de la forma de cristal I y/o II depende de las condiciones globales de cristalización.

Ejemplo 8

10 g de la forma de cristal I de astaxantina o de la forma II se mezclan con 90 g de aceite de soja. Los cristales se muelen y la suspensión micronizada resultante es adecuada para la preparación de formulaciones en polvo o se pueden disolver directamente en aceite usando un procedimiento de calentamiento ultrarrápido, seguido de enfriamiento con exceso de una fase oleosa o fase acuosa que comprende un emulsionante.

Ejemplo 9

10 g de la forma de cristal I de astaxantina o de la forma II se mezclan con 20 g de almidón. El polvo se procesa después hasta formar un granulado dispersable adecuado para rellenar cápsulas y formar comprimidos.

Ejemplo 10

En un matraz receptor que se puede calentar, se suspenden 4 g de la forma de cristal I de astaxantina o de la forma II y 1,54 g de aceite de cacahuete en una solución de 1,23 g de etoxiquina en 28,8 g de isopropanol/agua a 30 °C. Esta suspensión se mezcla a una temperatura de mezclado de 170 °C con 58,7 g de isopropanol/agua (88/12, en peso/peso) con un tiempo de resistencia de 0,2 segundos. La solución de astaxantina dispersa molecularmente resultante entra inmediatamente después en otra cámara de mezclado. Se añaden 11,34 g de una solución de gelatina acuosa, ajustada a un pH de 9, que, además de 8,4 g de gelatina A (100 Bloom, PM= 94.000) que contiene 4,2 g de Gelita Sol P (PM= 21.000) y 9,2 g de sacarosa para precipitar la astaxantina a 45 °C en forma dispersa

coloidalmente.

Ejemplo 11

- 5 Se prepara una composición en polvo disolviendo 1 g de la forma de cristal I de astaxantina con 8 g de etilcelulosa N4 (The Dow Chemical Company) y 1 g de alfa-tocoferol en 90 g de diclorometano (Fluka), seguido de eliminación del disolvente para producir un granulado, usando granulación por pulverización.

Ejemplo 12

- 10 Se prepara una composición en polvo disolviendo 0,80 g de la forma de cristal II de astaxantina con 8,4 g de etilcelulosa N4 (The Dow Chemical Company) y 0,80 g de alfa-tocoferol en 90 g de diclorometano (Fluka), seguido de eliminación del disolvente para producir un granulado, usando granulación por pulverización.

15 Ejemplo 13

- 20 620 mg de astaxantina (forma de cristal II) se mezclan con 200 ml de THF a temperatura ambiente y se filtran. Gota a gota se añaden 50 ml de la solución de THF a 250 ml de agua durante 30 minutos. Se forman principalmente precipitados coloidales de agregados de astaxantina que se pueden recoger mediante filtración.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla que consiste esencialmente en formas de cristal de astaxantina, que comprende
- 5 a) 95 % a 5 % en peso de la Forma de cristal I **caracterizada por** al menos uno de
- 10 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,
- ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , 82 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - -222^\circ \text{C}$; y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 35-45 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$; y
- 15 b) 5% a 95% en peso de la Forma de cristal II **caracterizada por** al menos uno de
- i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $7,2 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,05$, $6,5 \pm 0,05$, $5,48 \pm 0,05$, $5,34 \pm 0,05$, $5,27 \pm 0,05$, $4,49 \pm 0,05$, $4,38 \pm 0,05$, $4,12 \pm 0,05$, $3,89 \pm 0,05$, $3,61 \pm 0,05$, $3,56 \pm 0,05$, $3,34 \pm 0,05$, $3,32 \pm 0,05$, $3,22 \pm 0,05$; y,
- 20 ii) el espectro de Raman que contiene picos en 376 ± 2 , 337 ± 2 , 314 ± 2 , 304 ± 2 , 289 ± 2 , 206 ± 2 , 180 ± 2 , 137 ± 2 , 107 ± 2 , 93 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $225 - -240^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 10 - 30 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$.
- 25 2. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste esencialmente en
- 10% a 90 % en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I; y
- 90% a 10% en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II.
- 30 3. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste esencialmente en
- 20% a 80% en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I; y
- 80% a 20 % en peso de la forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal II.
- 35 4. Una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I **caracterizada por** al menos uno de
- 40 i) el patrón de difracción de rayos X que comprende el siguiente intervalo del plano intermatricial d en 10^{-10} m: $8,0 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,05$, $6,3 \pm 0,05$, $6,1 \pm 0,05$, $5,96 \pm 0,05$, $5,58 \pm 0,05$, $5,43 \pm 0,05$, $4,87 \pm 0,05$, $4,32 \pm 0,05$, $4,24 \pm 0,05$, $4,21 \pm 0,05$, $4,07 \pm 0,05$, $4,03 \pm 0,05$, $3,58 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,05$,
- ii) el espectro de Raman que contiene picos en 372 ± 2 , 346 ± 2 , 333 ± 2 , 312 ± 2 , 289 ± 2 , 234 ± 2 , 193 ± 2 , 178 ± 2 , 133 ± 2 , 82 ± 2 , cm^{-1} ; y, opcionalmente, al menos uno de
- 45 iii) una imagen de DSC que muestra una transición de fase a $212 - 222^\circ \text{C}$ y
- iv) un perfil de solubilidad en diclorometano de 35-45 g/l a $20^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$; que comprende todo-trans-astaxantina y al menos aproximadamente 13 % mol de al menos un compuesto carotenóide.
5. Una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho al menos un compuesto carotenóide se selecciona del grupo que consiste en 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25.
- 50 6. Una composición que comprende una forma cristalina de astaxantina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5.
- 55 7. Una forma de administración de astaxantina que comprende la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de formas de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en la industria de las ciencias de la vida.
- 60 8. Una forma de administración de astaxantina que comprende la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de formas de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en alimentos para peces en los que el contenido de astaxantina está por debajo de 20 % en peso.
- 65 9. Una forma de administración de astaxantina que comprende una suspensión de la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de formas de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en alimentos para peces, en la que dicha forma de administración comprende un aceite comestible.

10. Un procedimiento para preparar una mezcla de formas cristalinas de astaxantina designadas Forma de cristal I y Forma de cristal II de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos 5 % en peso/peso de la Forma I o la Forma II, que comprende las etapas de:

5 i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y de 7 % mol a 17 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente en el que la solubilidad de la astaxantina es al menos 1 mg/ml a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico opcionalmente con un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I o II, o mezclas de las mismas, y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.

15 11. Un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I, de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende las etapas de:

20 i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y al menos 13 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 disuelto en un disolvente en el que la solubilidad de la astaxantina es al menos 1 mg/ml a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico opcionalmente con un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.

30 12. Un procedimiento para preparar una forma cristalina de astaxantina designada forma de cristal I de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las etapas de:

35 i) usar una solución de una mezcla de astaxantina que comprende todo-trans-astaxantina y al menos 13 % mol de al menos un compuesto carotenoideo, seleccionado del grupo que consiste en al menos uno de 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25 en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en diclorometano, tricloroetano, cloroformo, dimetoximetano, dietoxietano, dioxaciclopentano, THF, NMP, N-etilpirrolidona, tolueno, piridina y disulfuro de carbono, a una temperatura hasta el punto ebullición de dicho disolvente y etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en iia) añadir un antidisolvente seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, terc-butanol y agua, iib) eliminar el disolvente mediante evaporación, opcionalmente mediante intercambio simultáneo del disolvente con un antidisolvente, iic) enfriar la solución del disolvente orgánico con la adición opcional de un agente de nucleación o semilla que comprende la forma de cristal I y iiii) recolectar, lavar con un antidisolvente y secar los cristales.

45 13. Un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en alimentos para peces y en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de las forma de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración.

50 14. Un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de las forma de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración, en la que dicha forma de administración comprende un dispersante lipófilo.

55 15. Un procedimiento para preparar una forma de administración que comprenden astaxantina para usar en la industria de las ciencias de la vida en la que la forma de cristal I de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de las forma de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1, se disuelve en un disolvente orgánico o aceite o mezclas de los mismos, seguido por el procesamiento posterior en dicha forma de administración, en la que dicha forma de administración comprende un dispersante hidrófilo.

60 16. Otra realización es un procedimiento para preparar una composición oleosa que comprende astaxantina en el que el procedimiento comprende disolver la forma de cristal I de acuerdo con la reivindicación 4 o mezclas de las formas de cristal de la astaxantina de la reivindicación 1 directamente en un aceite comestible y/o aceite de pescado a temperaturas entre 100 °C y 230 °C para incorporación directa en pastillas de alimento para peces y otras aplicaciones.

65

17. El procedimiento de cristalización controlada para preparar una mezcla de formas de cristal de astaxantina de acuerdo con la reivindicación 1 con una proporción deseada entre la forma de cristal I y la forma de cristal II, **caracterizado por que** la solución de cristalización comprende astaxantina y una cantidad predeterminada de al menos un compuesto carotenoideo.

5 18. Procedimiento de cristalización controlada de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado por que** al menos un compuesto carotenoideo es seleccionado de miembros del grupo que consiste en 9-cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, 15-cis-astaxantina, astaceno, semiastaceno y aldehído C-25.

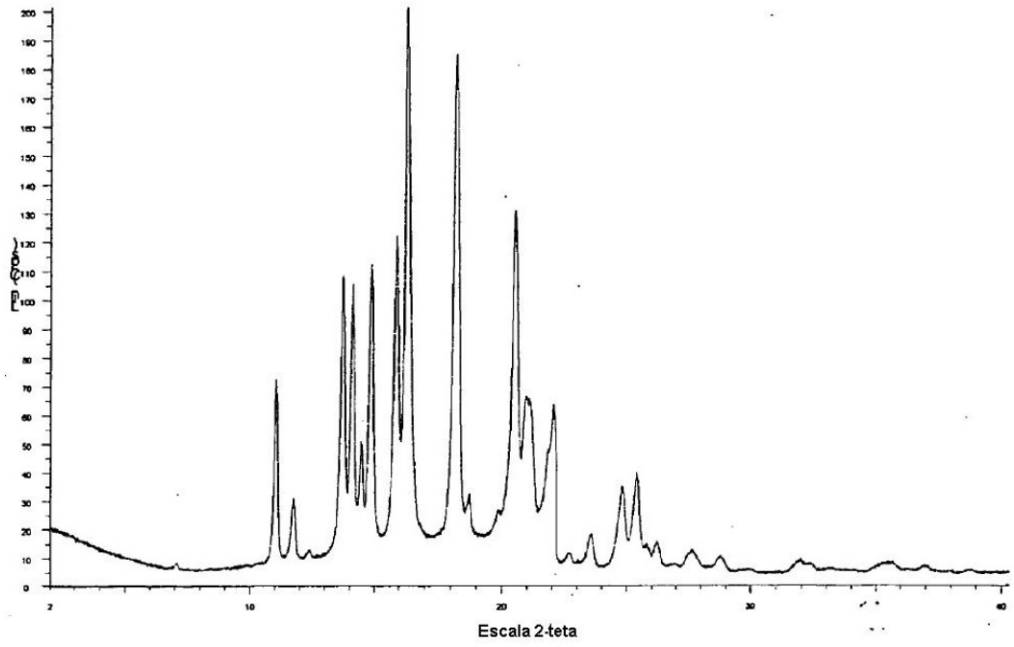


Fig. 1

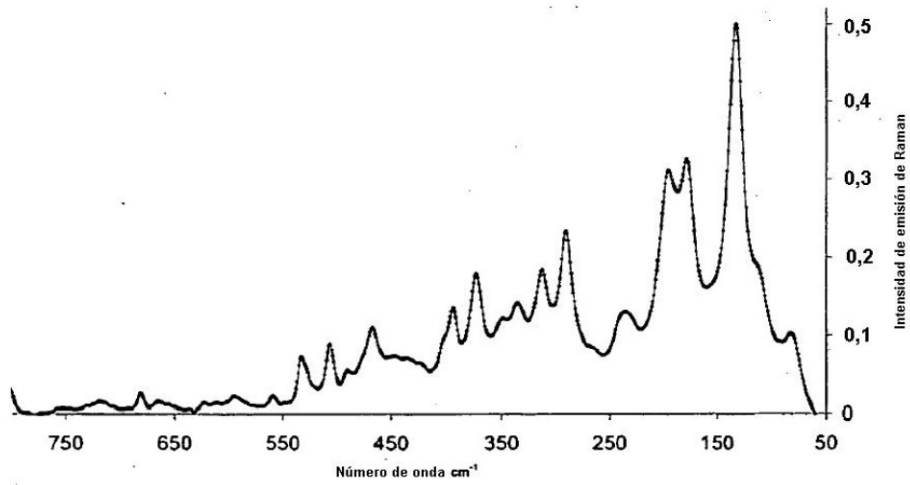


Fig. 2

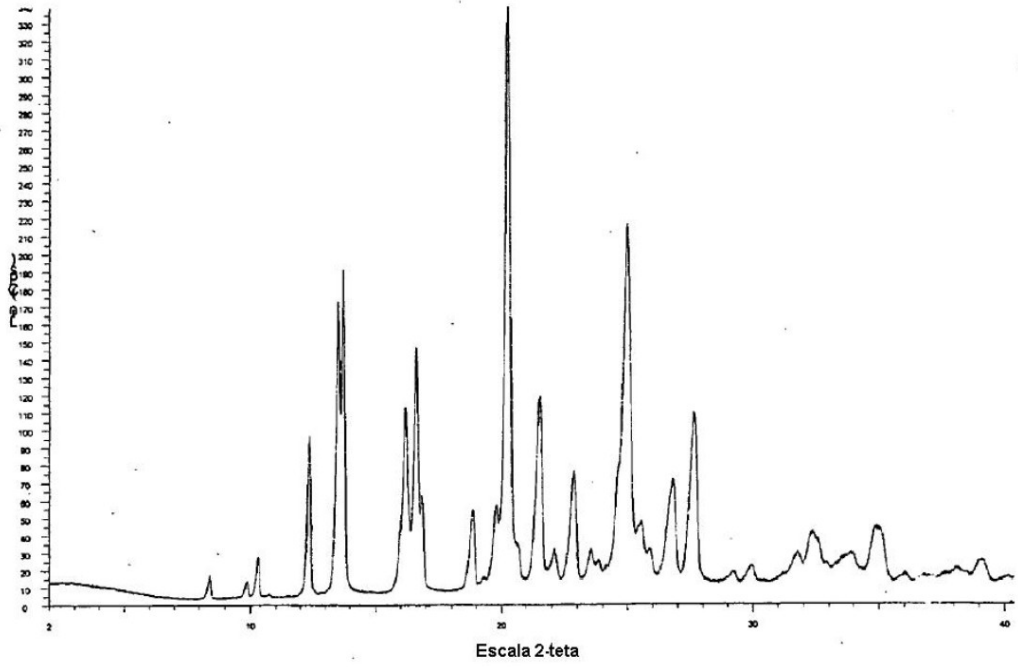


Fig. 3

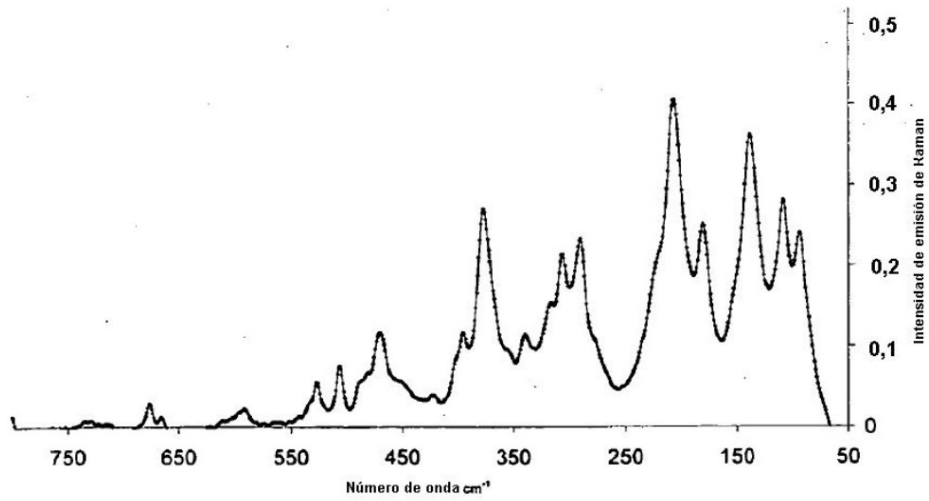
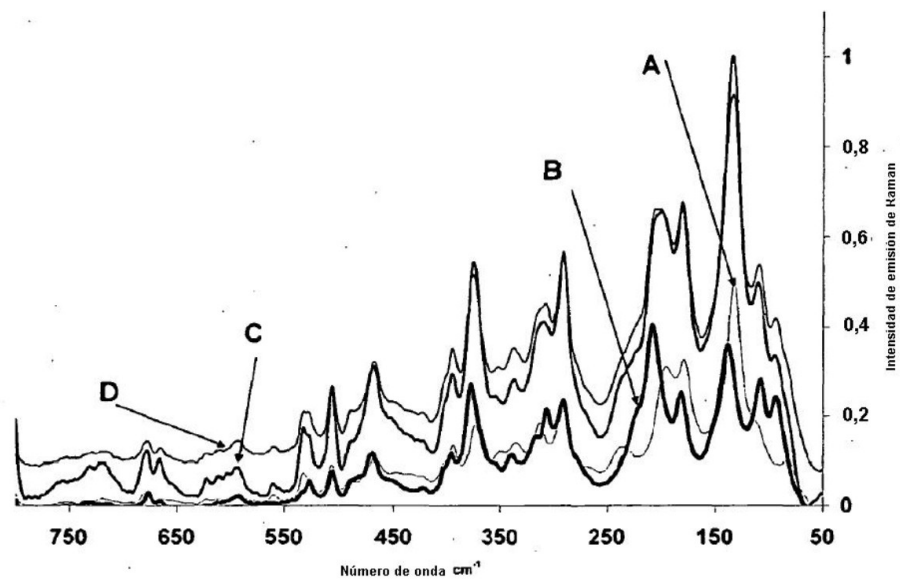


Fig. 4

Fig. 5



- A: Espectro de la forma de cristal I de astaxantina
- B: Espectro de la forma de cristal II de astaxantina
- C: Espectro medido de una mezcla de la forma I y la forma II de astaxantina
- D: Espectro calculado de una mezcla de la forma I y la forma II de astaxantina en una proporción de 0,55:0,45