

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 699**

51 Int. Cl.:

C30B 7/00 (2006.01)

C30B 29/60 (2006.01)

B01F 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/US2012/046636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13010066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12737684 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2732078**

54 Título: **Métodos para preparar composiciones nanocristalinas usando acústica enfocada**

30 Prioridad:

14.07.2011 US 201161507944 P

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**COVARIS, INC. (100.0%)
14 Gill Street, Unit H
Woburn MA 01801-1721, US**

72 Inventor/es:

**BECKETT, CARL;
LAUGHARN, JAMES A., JR. y
KAKUMANU, SRIKANTH**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 634 699 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

Métodos para preparar composiciones nanocristalinas usando acústica enfocada

5 **Antecedentes**

1. Campo de la invención

10 Los aspectos descritos en el presente documento se refieren al uso de energía acústica enfocada para preparar composiciones nanocristalinas. En algunos casos, las composiciones nanocristalinas y los sistemas y métodos asociados comentados en el presente documento pueden tener aplicación en campos relacionados con el suministro de agentes bioactivos.

2. Técnica relacionada

15 Pueden usarse sistemas de tratamiento acústico para exponer muestras a un campo acústico. Las muestras que pueden someterse a tratamiento acústico incluyen material genético (por ejemplo, ADN, ARN), material tisular (por ejemplo, hueso, tejido conjuntivo, tejido vascular), material vegetal (por ejemplo, hojas, semillas), células y otras sustancias. Pueden usarse sistemas de tratamiento acústico para tratar artículos biológicos y/o no biológicos. En
20 algunas disposiciones, la energía acústica puede ser relativamente intensa, lo que provoca que el material de muestra se fragmente, se lise o se rompa de otra forma. Por ejemplo, una muestra que contiene una pluralidad de células puede exponerse a tratamiento acústico de manera que las membranas celulares y otros componentes se descomponen o se degradan de otra forma de modo que se libera ADN u otro material genético en un líquido. El material genético puede recogerse entonces y usarse para diversos tipos de análisis. Los sistemas de tratamiento
25 acústico generan un campo acústico adecuado para estos procedimientos usando un transductor acústico. El campo acústico puede enfocarse o disponerse de otra forma para provocar el efecto deseado sobre el material de muestra. Se describen ejemplos de tales sistemas en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.948.843; 6.719.449; 7.521.023; y 7.687.026. El documento WO2012003003 (A2) se refiere al uso de energía acústica enfocada para preparar formulaciones (por ejemplo, nanoformulaciones) y/o sistemas para nanosuministro. El documento EP1925359 (A1)
30 se refiere a un método de formación de partículas sólidas a partir de una muestra, que incluye la etapa de exponer la muestra a un campo acústico enfocado que tiene una variable de onda acústica, hasta que las partículas sólidas logran un estado deseado de particularización. El documento WO2008016691 (A2) se refiere a sistemas y métodos para aplicar energía acústica a una muestra.

35 **Sumario**

Los aspectos descritos en el presente documento se refieren a métodos para preparar composiciones nanocristalinas usando procesamiento acústico ultrasónico enfocado. En particular, puede aplicarse energía acústica ultrasónica enfocada a una muestra que tiene un volumen generalmente grande (por ejemplo, mayor que el volumen
40 de una muestra que se contiene normalmente en un tubo de ensayo o mayor de 30 ml) de una manera que induce crecimiento cristalino en la muestra y que da como resultado una pluralidad de partículas nanocristalinas estables que tienen características submicrométricas. En algunas realizaciones, pueden formarse partículas nanocristalinas como una suspensión de partículas en una disolución líquida. En algunos casos, aunque no se requiere, pueden proporcionarse partículas nanocristalinas como agentes en sistemas de suministro para agentes bioactivos, tales
45 como productos farmacéuticos y/u otros compuestos terapéuticos.

La preparación de grandes volúmenes de composiciones nanocristalinas no es un requisito de la presente divulgación. Por ejemplo, se ha encontrado que aspectos que se refieren al control de determinados parámetros del proceso, tales como el número de ciclos por estallido, el ciclo de trabajo, la duración del tratamiento acústico
50 enfocado, el nivel de potencia del campo acústico enfocado, son eficaces en la producción de composiciones nanocristalinas adecuadas descritas en el presente documento.

En la preparación de una composición nanocristalina, una muestra que tiene, por ejemplo, un volumen generalmente grande puede disponerse e/o introducirse en un recipiente que tiene una cámara o región de procesamiento y al
55 menos una porción de la muestra puede exponerse a una zona focal de energía acústica que tiene una dimensión de tamaño de menos de 2 centímetros. El campo acústico enfocado puede generarse a partir de una fuente de energía acústica que funciona a un nivel de potencia adecuado durante determinado(s) periodo(s) de tiempo en condiciones apropiadas de manera que tras una exposición suficiente de la mezcla a la zona focal del campo acústico, puede dar como resultado una composición nanocristalina estable que tiene una pluralidad de partículas
60 con un tamaño promedio mayor de aproximadamente 10 nm. Por ejemplo, la fuente de energía acústica puede generar un campo acústico enfocado de un modo pulsado y puede producir un gran número de ciclos por estallido (por ejemplo, hasta 5000 ciclos por estallido).

En algunos casos, el campo acústico enfocado puede servir para nuclear sitios dentro de la muestra, dando lugar al
65 crecimiento cristalino de nanopartículas en los sitios de nucleación. El campo acústico enfocado también puede aumentar el crecimiento cristalino de nanopartículas, provocando que los cristales crezcan en la muestra a una

velocidad más rápida que la velocidad de crecimiento cristalino de nanopartículas si la muestra no se sometió adicionalmente al campo acústico enfocado. En algunas realizaciones, un campo acústico enfocado puede funcionar no sólo provocando la nucleación de sitios dentro de la muestra en la que puede producirse posteriormente el crecimiento cristalino, el campo acústico enfocado también puede partir porciones de material cristalino que han crecido dentro de la muestra. Aunque un campo acústico enfocado apropiado puede partir trozos de material cristalino en determinadas ubicaciones dentro de la muestra, en algunos casos, pueden crecer subcristales en las regiones de cristal en donde se había producido una fractura. En algunos casos, puede crecer un subcristal a partir de la porción de cristal que queda, o en algunos casos, puede crecer un subcristal a partir de la porción de cristal que se había partido del cristal principal.

Pueden procesarse altos volúmenes de muestra a través de acústica enfocada para formar partículas nanocristalinas a través del crecimiento cristalino, tales como muestras mayores de 50 ml, mayores de 100 ml, mayores de 1 l o incluso mayores. En algunas realizaciones, puede usarse un sistema de flujo pasante para tratar acústicamente una muestra que tiene un alto volumen. Por ejemplo, la muestra puede fluir a través de una cámara de proceso del recipiente de una manera tal que la muestra se expone a la zona focal del campo acústico enfocado mientras está dispuesta en la cámara de proceso. En diversas realizaciones, la preparación adecuada de las composiciones nanocristalinas descritas en el presente documento no requiere un sistema de flujo pasante. Por ejemplo, puede procesarse una muestra usando acústica enfocada para formar una composición nanocristalina en una cámara de proceso que no tiene una entrada o salida, tal como un tubo de ensayo, una pipeta o una placa de múltiples pocillos.

En algunos casos, la cámara de proceso puede tener un volumen que es menor que el volumen total de la muestra. Por ejemplo, una porción de la muestra puede pasar a través de la cámara de proceso y someterse a tratamiento acústico enfocado. La porción de muestra que se ha sometido a tratamiento acústico enfocado puede desplazarse entonces a otra ubicación en o fuera del sistema.

Diversas porciones de muestra pueden tratarse acústicamente una única vez o múltiples veces. Por ejemplo, la muestra puede fluir cíclicamente entre la cámara de proceso y un depósito. O, la muestra puede fluir a través de un sistema que tiene múltiples cámaras de proceso y procesarse acústicamente en cada una de las cámaras de proceso. En algunas realizaciones, la cámara de proceso puede ser un conducto alargado y la zona focal del campo acústico enfocado puede ser también alargada de modo que trata acústicamente la muestra a medida que la muestra fluye a través de la cámara de proceso. La velocidad de flujo de al menos una porción de la muestra a través del recipiente (por ejemplo, a través de la cámara de proceso) puede ser de al menos 0,1 ml/min, o entre aproximadamente 0,5 ml/min y aproximadamente 100 ml/min. Usando una disposición de flujo pasante, no hay ningún límite en cuanto al volumen de material de muestra que puede procesarse acústicamente.

Determinados parámetros del campo acústico enfocado, tales como los ciclos por estallido, pueden desempeñar un papel en la producción adecuada de una composición nanocristalina. En algunos casos, la nucleación de sitios para el crecimiento cristalino y/o el propio crecimiento cristalino pueden potenciarse tras ajustar apropiadamente los ciclos por estallido del campo acústico enfocado. En algunas realizaciones, el campo acústico enfocado puede hacerse funcionar dentro de un intervalo de entre 1000 ciclos por estallido y 6000 ciclos por estallido. Por ejemplo, un campo acústico enfocado usado para preparar composiciones nanocristalinas puede hacerse funcionar a más de 1000 ciclos por estallido, más de 2000 ciclos por estallido, más de 3000 ciclos por estallido, más de 4000 ciclos por estallido, más de 5000 ciclos por estallido o más de 6000 ciclos por estallido. En algunas situaciones, cuando se somete una muestra a un campo acústico enfocado que tiene una cantidad apropiada de ciclos por estallido (por ejemplo, 5000 ciclos por estallido), puede dar como resultado una composición nanocristalina estable con una distribución de tamaño de partícula estrecha.

Según la invención tal como se expone en la reivindicación 1, se proporciona un método de preparación de una composición nanocristalina. El método incluye proporcionar al menos una porción de una muestra que comprende un volumen de más de 30 ml en un recipiente; transmitir energía acústica enfocada mayor de 1000 ciclos por estallido que tiene una frecuencia de entre aproximadamente 100 kilohercios y aproximadamente 100 megahercios y una zona focal que tiene una dimensión de tamaño de menos de aproximadamente 2 centímetros a través de una pared del recipiente de manera que la muestra se dispone al menos parcialmente en la zona focal; y formar, a través del crecimiento cristalino, una pluralidad de partículas cristalinas en la muestra que tienen un tamaño promedio de más de aproximadamente 10 nm y un índice de polidispersidad de menos de 1,0 tal como se calcula según la norma internacional sobre dispersión de luz dinámica ISO 13321, mediante, al menos en parte, la exposición de la muestra a la zona focal.

En una realización ilustrativa adicional, se proporciona un método de preparación de una composición nanocristalina. El método incluye proporcionar al menos una porción de una muestra que comprende un volumen de más de 30 ml en un recipiente; transmitir energía acústica enfocada entre 1000 ciclos por estallido y 6000 ciclos por estallido que tiene una frecuencia de entre aproximadamente 100 kilohercios y aproximadamente 100 megahercios y una zona focal que tiene una dimensión de tamaño de menos de aproximadamente 2 centímetros a través de una pared del recipiente de manera que al menos una porción de la muestra se dispone en la zona focal; y formar, a través del crecimiento cristalino, una pluralidad de partículas cristalinas en la muestra que tienen un tamaño

promedio mayor de 10 nm y un índice de polidispersidad de menos de 1,0 tal como se calcula según la norma internacional sobre dispersión de luz dinámica ISO 13321, mediante, al menos en parte, la exposición de la muestra a la zona focal.

5 En otra realización ilustrativa, una muestra que comprende un volumen de más de 30 ml dispuesta en el recipiente, construido y dispuesto el recipiente para provocar el flujo de una porción de la muestra en el recipiente a una
10 velocidad de al menos 0,1 ml/min; y una fuente de energía acústica separada de y exterior al recipiente y adaptada para emitir energía acústica enfocada que tiene una frecuencia de entre aproximadamente 100 kHz y aproximadamente 100 MHz y una zona focal que tiene un tamaño de menos de aproximadamente 2 cm a través de
una pared del recipiente de manera que la muestra se dispone al menos parcialmente en la zona focal, en el que,
tras la exposición de la muestra a la zona focal durante un periodo de tiempo, la muestra comprende una pluralidad
de partículas cristalinas formadas a través del crecimiento cristalino y que tienen un tamaño promedio de más de
aproximadamente 10 nm y un índice de polidispersidad de menos de 1,0 tal como se calcula según la norma
internacional sobre dispersión de luz dinámica ISO 13321.

15 Diversas realizaciones de la presente invención proporcionan determinadas ventajas. No todas las realizaciones de la invención comparten las mismas ventajas y las que las comparten pueden no compartirlas en todas las circunstancias.

20 A continuación se describen en detalle características y ventajas adicionales de la presente invención, así como la estructura de diversas realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

25 Se describirán realizaciones no limitativas de la presente invención a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, que son esquemáticas y no se pretende que estén dibujadas a escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico ilustrado está representado normalmente por un único número. Para fines de claridad, no todos los componentes están marcados en cada figura, ni se muestra cada componente de cada realización de la invención cuando no es necesaria la ilustración para permitir a los expertos habituales en la técnica comprender la
30 invención. En las figuras:

la figura 1 muestra un diagrama esquemático de un sistema de tratamiento acústico según una realización ilustrativa;

35 la figura 2 ilustra un diagrama esquemático de otro sistema de tratamiento acústico según una realización ilustrativa;

la figura 3 representa un diagrama esquemático de un sistema de tratamiento acústico adicional según una realización ilustrativa;

40 la figura 4 muestra un diagrama esquemático de un sistema de tratamiento acústico diferente según una realización ilustrativa;

la figura 5 ilustra un diagrama esquemático de aún otro sistema de tratamiento acústico según una realización ilustrativa;

45 la figura 6 ilustra un diagrama esquemático de una cámara de proceso de un sistema de tratamiento acústico según una realización ilustrativa;

la figura 7 representa una distribución de tamaño de partícula de una muestra según un ejemplo;

50 la figura 8 representa una distribución de tamaño de partícula de una muestra según otro ejemplo;

la figura 9 ilustra la distribución de tamaño de partícula de la muestra de la figura 8 tras un periodo de tiempo;

55 la figura 10 representa una distribución de tamaño de partícula de una muestra según un ejemplo diferente;

la figura 11 ilustra la distribución de tamaño de partícula de la muestra de la figura 10 tras un periodo de tiempo;

la figura 12 representa una distribución de tamaño de partícula de una muestra según aún otro ejemplo;

60 la figura 13 ilustra la distribución de tamaño de partícula de la muestra de la figura 12 tras un periodo de tiempo;

la figura 14 representa una distribución de tamaño de partícula de una muestra según otro ejemplo;

65 la figura 15 ilustra la distribución de tamaño de partícula de la muestra de la figura 14 tras un periodo de tiempo;

la figura 16 es una vista en perspectiva en despiece ordenado de un sistema de tratamiento acústico en una realización que incluye una cámara que se recibe en un recipiente;

la figura 17 es una vista en sección transversal de la realización de la figura 16 en un estado ensamblado;

la figura 18 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene un sistema de intercambio de calor con camisa;

la figura 19 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene un elemento de inserción en una realización ilustrativa;

la figura 20 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene un elemento de inserción que incluye varillas suspendidas y elementos esféricos en una realización ilustrativa;

la figura 21 es una realización ilustrativa de un sistema de tratamiento acústico que incluye un depósito con un agitador;

la figura 22 es una realización ilustrativa de un sistema de tratamiento acústico dispuesto para el flujo oscilante de material;

la figura 23 es una realización ilustrativa de un sistema de tratamiento acústico dispuesto para el tratamiento en serie de material usando múltiples cámaras de tratamiento;

la figura 24 muestra un diagrama esquemático de un sistema de tratamiento acústico en una realización;

la figura 25 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico en otra realización ilustrativa;

la figura 26 es una vista en perspectiva de la cámara de tratamiento acústico de la figura 24;

la figura 27 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene una cúpula con una conformación cónica;

la figura 28 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene una cúpula con una conformación cilíndrica; y

la figura 29 es una vista en sección transversal de una cámara de tratamiento acústico que tiene una cúpula con una porción cónica y una cilíndrica.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a métodos de uso de acústica enfocada para preparar rápida y eficazmente grandes volúmenes de composiciones nanocristalinas. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser repetibles, controlables, producir resultados rápidamente, evitar la contaminación cruzada del material de muestra y/o pueden ser isotérmicos (es decir, evitan el sobrecalentamiento de la muestra tras el tratamiento acústico). Las composiciones nanocristalinas y la capacidad para crear volúmenes grandes o pequeños de las mismas de una manera conveniente y sencilla pueden ser útiles para promover los métodos existentes de administración terapéutica así como para preparar sistemas para administración terapéutica. En algunas realizaciones, pueden exponerse muestras a un campo acústico enfocado de una manera que provoca el crecimiento cristalino dentro de la muestra, formando composiciones nanocristalinas. Por ejemplo, pueden tratarse grandes volúmenes de muestra tales como un volumen de más de aproximadamente 30 ml (por ejemplo, mayor que el volumen de una muestra normalmente encontrado en un tubo de ensayo o placa de múltiples pocillos) con acústica enfocada para dar como resultado el crecimiento cristalino en la muestra. Las partículas nanocristalinas tienen generalmente un tamaño de partícula promedio de más de 10 nm o de entre 10 nm y 1 micrómetro y una distribución de tamaño de partícula estrecha (por ejemplo, índice de polidispersidad menor de 1,0 o menor de 0,1).

En algunas realizaciones, al menos una porción de la muestra puede hacerse fluir a través del recipiente (por ejemplo, a través de una cámara de proceso) durante el procesamiento por acústica enfocada a una velocidad de al menos 0,1 ml/min. Otras disposiciones que no incluyen un sistema de flujo pasante pueden usarse para tratar una muestra con un campo acústico enfocado. En algunas realizaciones, puede generarse un campo acústico enfocado para procesar una muestra para la formación de una composición nanocristalina en una cámara de proceso que no tiene una entrada o salida, por ejemplo, un tubo de ensayo, una pipeta, una placa de múltiples pocillos u otra disposición adecuada (por ejemplo, una cámara cerrada, recipiente de mezclado, etc.).

“Energía sónica” tal como se usa en el presente documento pretende abarcar términos tales como energía acústica, ondas acústicas, pulsos acústicos, energía ultrasónica, ondas ultrasónicas, ultrasonidos, ondas de choque, energía sonora, ondas sonoras, pulsos sónicos, pulsos, ondas, o cualquier otra forma gramatical de estos términos, así

como cualquier otro tipo de energía que tenga características similares a la energía sónica. “Zona focal” o “punto focal” tal como se usa en el presente documento significa un área en donde la energía sónica converge e/o incide sobre una diana, aunque ese área de convergencia no sea necesariamente un único punto enfocado, sino que puede incluir un volumen de conformación y tamaño variables. Tal como se usan en el presente documento, los términos “cámara de proceso” o “zona de procesamiento” tal como se usan en el presente documento significan un recipiente o región donde la energía sónica converge, y el material de muestra está presente para su tratamiento. Tal como se usa en el presente documento, “acústica no lineal” puede significar la falta de proporcionalidad entre el aporte y la emisión. Por ejemplo, a medida que la amplitud aplicada al transductor acústico aumenta, la emisión sinusoidal pierde proporcionalidad de manera que finalmente la presión positiva máxima aumenta a una velocidad mayor que la presión negativa máxima. Además, el agua se vuelve no lineal a intensidades de energía acústica altas, y en un campo acústico convergente, las ondas se alteran más a medida que la intensidad aumenta hacia el punto focal. Las propiedades acústicas no lineales del tejido pueden ser útiles en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Tal como se usa en el presente documento, “propagación acústica” puede significar la generación de flujo de fluido por ondas acústicas. El efecto puede ser no lineal. Puede crearse un flujo de fluido global de un líquido en la dirección del campo sonoro como resultado del impulso absorbido a partir del campo acústico. Tal como se usa en el presente documento, “micropropagación acústica” puede significar la circulación independiente del tiempo que se produce sólo en una pequeña región del fluido alrededor de una fuente u obstáculo, por ejemplo, una burbuja impulsada acústicamente en un campo sonoro. Tal como se usa en el presente documento, “absorción acústica” puede referirse a una característica de un material que se refiere a la capacidad del material para convertir energía acústica en energía térmica. Tal como se usa en el presente documento, “impedancia acústica” puede significar una razón de presión sonora sobre una superficie con respecto al flujo sonoro a través de la superficie, teniendo la razón una componente de reactancia y una de resistencia. Tal como se usa en el presente documento, “ventana acústica” puede significar un sistema o dispositivo para permitir que la energía sónica pase a través de la muestra dentro de la zona o cámara de procesamiento. Tal como se usa en el presente documento, “lente acústica” puede significar un sistema o dispositivo para separar, converger o dirigir de otra forma las ondas sonoras. Tal como se usa en el presente documento, “dispersión acústica” puede significar una reflexión y difracción irregular y multidireccional de las ondas sonoras producida por múltiples superficies reflectantes, cuyas dimensiones son pequeñas en comparación con la longitud de onda, o por determinadas discontinuidades en el medio a través del cual se propaga la onda.

Aunque se ha usado la ultrasonía para una variedad de fines de diagnóstico, terapéuticos y de investigación, los efectos biofísicos, químicos y mecánicos generalmente sólo se entienden de manera empírica. Algunos usos de la energía sónica o acústica en el procesamiento de materiales incluyen “sonicación”, que es un proceso sin refinar de alteración mecánica que implica la inmersión directa de una fuente de ultrasonidos no enfocados que emite energía en el intervalo de kilohercios (kHz) bajo (por ejemplo, 15 kHz) al interior de una suspensión de fluido del material que está tratándose. Por consiguiente, la energía sónica produce resultados contradictorios debido a la naturaleza no enfocada y aleatoria de las ondas acústicas y son propensas a inducir sobrecalentamiento de la muestra, ya que la energía se dispersa, absorbe y/o no se alinea apropiadamente con la diana.

En contraposición a algunos usos anteriores de la energía sónica, el uso de “acústica enfocada” tal como se describe en el presente documento en la preparación de composiciones nanocristalinas tiene beneficios significativos, incluyendo los enumerados a continuación. La acústica enfocada proporciona un beneficio definido porque permite la preparación estable y reproducible de composiciones nanocristalinas que tienen una distribución de tamaño de partícula deseada (por ejemplo, que tienen un intervalo adecuado de tamaño de partícula con una distribución estrecha). La acústica enfocada también proporciona el procesamiento y la preparación de composiciones nanocristalinas con poco o nada de calentamiento adverso de la muestra durante el procesamiento acústico (por ejemplo, proporcionando la capacidad para tratar acústicamente una muestra de manera isotérmica). Pueden procesarse composiciones en un entorno contenido, es decir, un sistema cerrado, que permite una operación sin contacto estéril sin riesgo de contaminación. El tratamiento acústico enfocado es altamente ampliable a escala hasta tamaños de muestra que tienen volúmenes mayores que el de volúmenes de muestra típicos contenidos en recipientes de un único uso, tales como un tubo de ensayo, una punta de pipeta o una placa de múltiples pocillos. Adicionalmente, los métodos de acústica enfocada descritos en el presente documento pueden implicar una operación de proceso sencilla que requiere una pequeña cantidad de trabajo, y unas aptitudes del operario generalmente más bajas que las requeridas para la sonicación convencional o métodos de aplicación de energía acústica a materiales de muestra. Puede usarse la acústica enfocada según los métodos de acústica enfocada adaptable (AFA) proporcionados por Covaris, Inc, Woburn, MA.

Pueden emplearse campos acústicos enfocados para crear sitios de nucleación dentro de una muestra donde se permite que se produzca el crecimiento cristalino de nanopartículas en los sitios de nucleación. En algunos casos, la nucleación se produce a un nivel justo más allá de la saturación en la muestra donde los efectos de la cristalización y la precipitación cristalino superan la tendencia del compuesto que cristaliza a redisolverse en la disolución. Una vez formados los sitios de nucleación, puede producirse el crecimiento cristalino con o sin exposición adicional a la energía acústica enfocada. Sin embargo, la exposición adicional a la energía acústica enfocada puede potenciar la velocidad de crecimiento cristalino de las nanopartículas. Sin embargo, en algunos casos, la velocidad de crecimiento cristalino no se ve afectada por la exposición adicional al campo acústico enfocado más allá de la nucleación inicial. Aunque la nucleación y el crecimiento cristalino pueden producirse al mismo tiempo, dependiendo

de diversas condiciones del tratamiento acústico enfocado, puede ajustarse uno de nucleación o crecimiento cristalino para que predomine con respecto al otro, produciendo de manera controlable materiales nanocristalinos que tienen una variedad de conformaciones y tamaños, de una manera reproducible.

A medida que las partículas nanocristalinas experimentan crecimiento cristalino y aglomeración, un campo acústico enfocado puede alterar las aglomeraciones de partículas de una manera en la que porciones de las partículas nanocristalinas y/o aglomeraciones se rompen en dos o más trozos. En algunas realizaciones, la región de fractura de las partículas nanocristalinas puede servir, a su vez, como sitios de nucleación para que se produzca el crecimiento cristalino adicional de subcristales dentro de la muestra. Por consiguiente, la acústica enfocada puede instigar y propagar un proceso dinámico en el que están creciendo cristales dentro de la muestra, aunque los cristales también se rompen/fracturan, dando lugar a sitios de nucleación en donde se produce el crecimiento cristalino adicional en los sitios de nucleación. Un proceso de este tipo de crecimiento cristalino y micronización dentro de la muestra puede dar como resultado una formulación que tiene una distribución de tamaño de partícula estrecha estable, con un tamaño de partícula promedio submicrométrico.

En la formación de composiciones nanocristalinas con características preferidas, pueden entrar en juego varios factores, tales como por ejemplo, el tiempo en el que la muestra se procesa acústicamente; el tiempo en el que la muestra no se somete a acústica enfocada; si se añade material adicional (por ejemplo, coformador, material/cristal simiente, etc.) a la muestra antes de, durante o después del tratamiento acústico; la naturaleza del propio material de muestra (por ejemplo, la tendencia del material al crecimiento cristalino); la concentración de la composición que va a cristalizarse dentro de la muestra; la temperatura de la muestra (por ejemplo, si el tratamiento se produce de manera isotérmica, o con una disminución gradual en la temperatura); la emisión de potencia del transductor acústico en la creación del campo acústico enfocado; el patrón de emisión acústica enfocada (por ejemplo, acústica pulsada, ciclos por estallido, etc.); la velocidad de flujo de la muestra a través de la cámara de proceso; el número de veces que la muestra se trata con un campo acústico enfocado; u otros factores de influencia.

En algunas realizaciones, puede aplicarse un campo acústico enfocado a una muestra para crear un sitio de nucleación y entonces el transductor acústico puede apagarse de modo que los cristales crecen en ausencia de la energía acústica enfocada. Una disposición de este tipo, en algunos casos, puede dar lugar a que se formen cristales más grandes debido a la falta de fuerzas disruptivas en comparación con una muestra resultante que tiene una exposición continuada a la energía acústica enfocada.

Puede aplicarse energía acústica enfocada a una muestra para inducir cristalización según cualquier protocolo adecuado. En algunos casos, se proporciona energía acústica enfocada de una manera pulsada que puede crear un efecto cíclico que implica fuerzas de compresión y expansión. Como tal, en algunos casos, la acústica enfocada pulsada puede crear un entorno donde se nucleen sitios de cristal y posteriormente se les proporciona a los cristales el espacio y la energía para crecer de manera predecible. En algunas realizaciones, la muestra se expone a la energía acústica enfocada a periodos de tiempo intermitentes. Por ejemplo, la muestra puede procesarse mediante un campo acústico enfocado durante un primer periodo de tiempo (por ejemplo, menos de 1 minuto) y luego puede permitirse que la muestra permanezca durante un periodo de tiempo (por ejemplo, menos de 1 minuto) sin someterse al campo acústico enfocado. La muestra puede procesarse posteriormente de nuevo de un modo repetido de una manera que da lugar a una composición nanocristalina estable que tiene una distribución de tamaño de partícula y morfología deseadas. Por consiguiente, dependiendo del protocolo de tratamiento acústico enfocado, la distribución de tamaño de partícula de las partículas nanocristalinas puede controlarse adecuadamente.

Antes del procesamiento por acústica enfocada, las muestras pueden presentar cualquier formulación adecuada. En algunas realizaciones, antes de la exposición a un campo acústico enfocado, una muestra puede estar en forma de una disolución que no incluye ninguna partícula dentro de la disolución. Por consiguiente, cuando la muestra se expone a energía acústica enfocada, precipitan pequeñas partículas de la disolución y sirven como sitios de nucleación para que se produzca el crecimiento cristalino sobre las partículas. En algunas realizaciones, antes de que la muestra se exponga a un campo acústico enfocado, la muestra puede estar en forma de una suspensión o una emulsión donde ya están incluidas pequeñas partículas o componentes insolubles dentro de la muestra. Como tal, el campo acústico enfocado puede funcionar creando sitios de nucleación sobre las partículas en suspensión y/o aumentando el crecimiento cristalino de las partículas dentro de la muestra.

Los inventores han reconocido y apreciado que una cantidad sustancial de composiciones químicas producidas por la industria farmacéutica, con varios fármacos existentes actualmente en el mercado, son compuestos lipófilos (escasamente solubles). Como resultado de tal escasa solubilidad, los agentes farmacéuticos tienden a presentar una corta semivida biológica, escasa biodisponibilidad, efectos adversos relevantes y una estabilidad globalmente disminuida. Se deduce entonces que para evaluar tales composiciones en la fase preclínica, la composición se dosifica a menudo por vía oral como una suspensión de base acuosa. Una desventaja de la dosificación de una suspensión de base acuosa es que pueden surgir consecuencias *in vivo* perjudiciales, tales como biodisponibilidad disminuida y mayor variabilidad entre sujetos, en comparación a la dosificación con una formulación de disolución. La biodisponibilidad se refiere al porcentaje de una dosis administrada de un fármaco que alcanza la circulación sistémica a través de absorción y/o metabolismo corporal. Una formulación de disolución, en cambio, no puede lograrse fácilmente usando métodos convencionales sin o bien niveles tóxicos de excipientes y/o bien un gasto de

recursos considerable, lo que hace por tanto que la evaluación en fase temprana de un alto número de compuestos no sea práctica. La producción de formulaciones (por ejemplo, suspensiones) que tienen composiciones nanocristalinas con un tamaño de partícula promedio relativamente pequeño que permanecen estables puede ayudar a mitigar algunos de los problemas mencionados anteriormente.

Aunque pueden producirse pequeñas partículas a través de procesos mecánicos tales como molienda, tales procesos pueden dañar o afectar de manera perjudicial a las propiedades del material (por ejemplo, morfología) de las partículas molidas. En algunas aplicaciones terapéuticas, tales como inhalación farmacéutica o administración oral, la conformación de las partículas puede afectar a cómo se captan las partículas en el cuerpo. Como resultado, puede usarse tratamiento acústico enfocado para producir de manera reproducible composiciones nanocristalinas que tienen morfologías y distribuciones de tamaño de partícula preferidas.

Las distribuciones de tamaño de partícula de las composiciones nanocristalinas descritas en el presente documento pueden medirse usando cualquier método adecuado. En algunas realizaciones las distribuciones de tamaño de partícula se miden usando dispersión de luz láser dinámica, también denominada espectroscopía de correlación fotónica (por ejemplo, usando los instrumentos Zetasizer-S, Zetasizer Nano ZS-90 o Mastersizer 2000 de Malvern; Malvern Instruments Inc.; Southborough MA). El instrumento Zetasizer-S de Malvern se usó para estimar los tamaños de partícula promedio con un láser de He-Ne de 4 mW que funciona a una longitud de onda de 633 nm y un detector de fotodiodos de avalancha (APD). El tamaño promedio de las partículas en una composición nanocristalina puede estimarse como el tamaño hidrodinámico medio. La distribución de tamaño de partícula puede estimarse según el índice de polidispersidad (PDI), que se conoce en la técnica como una medida de la estrechez de una distribución. El tamaño promedio de las partículas y el PDI de las composiciones nanocristalinas comentadas en el presente documento se calculan según la norma internacional sobre dispersión de luz dinámica, ISO 13321.

Las partículas de las composiciones nanocristalinas pueden tener cualquier conformación tridimensional, tal como una cuboide, paralelepípeda, hexaédrica, poliédrica, etc. Puede apreciarse que el término "tamaño de partícula", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un tamaño de partícula estimado tal como se evalúa mediante métodos conocidos en la técnica. Aunque los materiales de cristal producidos por los sistemas y métodos descritos tienen generalmente una naturaleza facetada, el tamaño de partícula puede referirse a un diámetro estimado de una partícula que asume una conformación generalmente esférica según los métodos de medición de la dispersión de luz anteriores. O, el tamaño de partícula puede referirse a una anchura, longitud u otra dimensión estimadas de un poliedro, tal como un cuboide o paralelepípedo. En algunos casos, el tamaño de partícula puede estimarse usando microscopía de alta resolución, tal como microscopía electrónica (por ejemplo, SEM, TEM, etc.) o microscopía de fuerza atómica.

El tamaño de partícula promedio de las composiciones nanocristalinas preparadas mediante sistemas y métodos de acústica enfocada descritos en el presente documento puede variar adecuadamente dependiendo de la aplicación y los materiales que se cristalizan. En algunas realizaciones, el tamaño de partícula promedio de las composiciones nanocristalinas que se han procesado a través de tratamiento acústico enfocado es de entre 10 nm y 1 micrómetro, entre 100 nm y 900 nm, entre 500 nm y 900 nm, entre 500 nm y 700 nm, entre 100 nm y 500 nm, entre 100 nm y 300 nm.

Los procesos de tratamiento acústico enfocado pueden ampliarse a escala para tratar acústicamente cualquier volumen apropiado de material de muestra según los sistemas y métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, un recipiente de tratamiento puede tener una o más entradas y/o salidas adecuadas que permiten que el material de muestra fluya dentro y fuera del recipiente o una cámara de proceso del recipiente. Una vez dispuesto adecuadamente en el recipiente o la cámara de proceso, el material de muestra puede someterse a tratamiento acústico enfocado en un conjunto apropiado de condiciones. Tras un grado suficiente de tratamiento acústico enfocado, el material de muestra puede descargarse del recipiente o la cámara de proceso, permitiendo que más muestra que no se había tratado anteriormente se someta a tratamiento acústico enfocado. Para diversas realizaciones descritas en el presente documento, un recipiente de tratamiento puede considerarse equivalente a una cámara de proceso.

En algunas realizaciones, un sistema de tratamiento acústico puede incluir un depósito y una cámara de proceso, teniendo cada uno entradas y salidas que están en comunicación de fluido entre sí; es decir, se permite que el fluido se desplace entre el depósito y la cámara de proceso por medio de conductos adecuados. Por consiguiente, puede hacerse que el material de muestra del depósito se traslade a la cámara de proceso para su tratamiento acústico enfocado en condiciones apropiadas y posteriormente puede hacerse que se traslade de nuevo al depósito. Como resultado, puede procesarse acústicamente material de muestra de un modo cíclico en donde porciones de material de muestra pueden recibir tratamiento acústico enfocado múltiples veces.

En algunas realizaciones, el material de muestra puede trasladarse desde un depósito de suministro hasta una cámara de proceso para el tratamiento acústico enfocado. El material de muestra tratado puede trasladarse posteriormente desde la cámara de proceso hasta un recipiente diferente separado del depósito de suministro. Como tal, el material de muestra puede experimentar un único tratamiento acústico.

En algunas realizaciones, el material de muestra puede trasladarse desde un depósito de suministro a través de múltiples cámaras de proceso para lograr niveles variables de procesamiento, tal como diferentes condiciones de acústica enfocada. También pueden proporcionarse conductos adicionales para la adición/retirada de material de muestra, lo que puede servir para potenciar la cristalización o puede aumentar/disminuir la velocidad de crecimiento cristalino. En un ejemplo, puede introducirse material adicional en la muestra a través de un conducto y, tras la combinación con el material de muestra, pueden aumentarse la nucleación cristalina, precipitación y/o crecimiento.

En algunas realizaciones, la cámara de proceso es un conducto a través del cual fluye material de muestra. Como tal, la muestra puede recibir tratamiento acústico enfocado a partir de múltiples transductores y/o la muestra puede recibir tratamiento acústico enfocado a partir de un transductor que genera una zona focal que está conformada de una manera que atraviesa una distancia sustancial del conducto de la cámara de proceso.

La figura 1 ilustra un sistema de procesamiento acústico enfocado según sistemas descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.948.843; 6.719.449; y 7.521.023. El sistema utiliza un transductor piezoeléctrico 1020 para generar ondas de energía acústica 1022 dirigidas hacia una muestra 1042 que está contenida dentro de un espacio definido por un recipiente de proceso 1040. El recipiente de proceso 40 está situado dentro de un recipiente de baño de fluido 1030 que tiene un medio de acoplamiento acústico 1032 (por ejemplo, agua) ubicado en el mismo y en contacto con una superficie exterior del recipiente de proceso. Se transmiten ondas de energía acústica 1022 desde el transductor 1020, a través del medio 1032, a través de una pared 1040 del recipiente de proceso y convergen en una zona focal 1024 dentro o cerca de las paredes del recipiente de proceso. La frecuencia de las ondas acústicas puede tener cualquier intervalo adecuado, tal como de entre aproximadamente 100 kilohercios y aproximadamente 100 megahercios, o de entre aproximadamente 500 kilohercios y aproximadamente 10 megahercios. La zona focal 1024 está en proximidad estrecha con la muestra 1042 de manera que se aplica energía mecánica isotérmica sin contacto a la muestra 1042. La zona focal puede tener cualquier conformación y tamaño adecuados, tal como tener una dimensión de tamaño (por ejemplo, anchura, diámetro) de menos de 2 cm, menos de 1 cm o menos de 1 mm.

Tal como se comentó anteriormente, los inventores han reconocido y apreciado que sería ventajoso que los procesos de tratamiento de material de muestra con sistemas acústicos enfocados se ampliaran a escala para el tratamiento de volúmenes más grandes de material. Aunque el sistema de la figura 1 puede incorporar mecanismos mecánicos y/o eléctricos que permiten el movimiento relativo entre un transductor y un recipiente de proceso, el material de muestra está contenido generalmente dentro del espacio definido por el recipiente 1040. Como tal, para tratar posteriormente el material de muestra, el transductor y/o el recipiente de proceso deben desplazarse uno con respecto al otro. Como ejemplo, una vez que un material de muestra contenido dentro de un tubo de ensayo (es decir, recipiente de proceso) se trata completamente, el tubo de ensayo se separa del transductor de modo que un recipiente de proceso posterior que contiene un material de muestra diferente puede desplazarse a una posición adecuada para su tratamiento acústico enfocado. O, cuando el material de muestra contenido en un pocillo de una microplaca se trata suficientemente, la microplaca puede desplazarse en relación con el transductor de manera que un pocillo vecino que contiene un material de muestra diferente se coloca en una posición adecuada para su procesamiento.

La figura 2 representa un sistema de procesamiento acústico 1010 que permite el flujo de entrada y flujo de salida de material de muestra sin la necesidad de que se desplace el transductor 1020 o una cámara de proceso 1050 (o recipiente de proceso). El sistema de la figura 2 es generalmente similar al sistema mostrado en la figura 1 que incluye una cámara de proceso 1050 que tiene material de muestra 1052 dispuesto en la misma; sin embargo, el sistema también incluye una fuente de muestra 1060 y un drenaje de muestra 1070. La cámara de proceso 1050 incluye una entrada 1062 en comunicación de fluido con un conducto 1064 para permitir el flujo de entrada de material de muestra desde la fuente 1060 a través del conducto 1064 a lo largo de la dirección de la flecha A y al interior de la cámara de proceso 1050. La cámara de proceso también incluye una salida 1072 que permite un flujo de salida de material de muestra desde la cámara de proceso y al interior de un conducto 1074 a lo largo de la dirección de la flecha B que proporciona un flujo de fluido de material de muestra al drenaje 1070.

Por consiguiente, el sistema de la figura 2 proporciona la capacidad de que el material de muestra sin tratar que se traslada a través del recipiente del sistema, al interior de la cámara de proceso, se trate con energía acústica enfocada y posteriormente se traslade fuera de la cámara de proceso. Un sistema de este tipo permite que se trate un gran volumen de material de muestra con acústica enfocada al tiempo que no se requiere el movimiento de la cámara de proceso o el transductor uno con respecto al otro. Tal como se mencionó anteriormente, la cantidad de material de muestra que puede procesarse en un sistema de este tipo es ilimitada, ya que puede fluir de manera continua material de muestra a través de la cámara de proceso y, por tanto, someterse a tratamiento acústico enfocado. La fuente 1060 puede ser un depósito finito que contiene un volumen limitado de material de muestra que va a tratarse, o alternatively, la fuente puede extraer de un suministro continuo de material de muestra para su procesamiento acústico, tal como un depósito que se repone de manera constante. De manera similar, el drenaje 1070 puede ser un recipiente que contiene un volumen finito de material de muestra ya tratado, o, por ejemplo, el drenaje puede alimentar un depósito o cuerpo más grande de material de muestra tratado que se extrae de manera continua para fines/aplicaciones adecuados.

En algunas realizaciones, pueden procesarse volúmenes grandes y/o pequeños de muestra a través de acústica enfocada para formar partículas nanocristalinas, por medio de crecimiento cristalino, tales como muestras mayores de 30 ml, mayores de 50 ml, mayores de 100 ml, mayores de 1 l, o incluso mayores. La figura 3 representa otra realización ilustrativa de un sistema de procesamiento acústico enfocado 100 que permite un enfoque ampliado a escala para tratar material de muestra con acústica enfocada. El sistema proporciona la capacidad de que el material de muestra se trate múltiples veces. El sistema incluye un depósito 120 para contener un suministro de material de muestra y una cámara de proceso 110 que proporciona un espacio para que el material de muestra experimente tratamiento acústico. El depósito 120 incluye una salida de depósito 122 y una entrada de depósito 124 para permitir el flujo de entrada y el flujo de salida de material de muestra hasta y desde el depósito. De manera similar, la cámara de proceso 110 incluye una entrada de cámara 112 y una salida de cámara 114 para permitir el flujo de entrada y flujo de salida de material de muestra hasta y desde la cámara de proceso. La salida de depósito 122 permite que el material de muestra se traslade a lo largo de la dirección de la flecha C desde el depósito al interior de un conducto 130 y adicionalmente al interior de la cámara de proceso por medio de la entrada de cámara 112. Tras un tratamiento acústico suficiente del material de muestra, puede salir una cantidad apropiada de material de muestra de la cámara de proceso por medio de la salida de cámara 114, al interior de un conducto 140 de modo que se traslada a lo largo de la dirección de la flecha D y de nuevo al interior del depósito 120 por medio de la entrada de depósito 124.

Por consiguiente, una mayor cantidad de material de muestra puede tratarse acústicamente en el recipiente del sistema global que el volumen que está definido por el espacio de la cámara de proceso. La única limitación con respecto a cuánto volumen de material de muestra puede tratarse con un recipiente de este tipo depende del tamaño del depósito, que puede ser cualquier volumen adecuado. Además, el material de muestra puede tratarse acústicamente múltiples veces ya que el material ya procesado que se transporta de nuevo al depósito desde la cámara de proceso puede hacerse en última instancia que se desplace de nuevo desde el depósito al interior de la cámara de proceso para su tratamiento acústico adicional.

Puede proporcionarse cualquier estructura adecuada como entrada y/o salida, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, las entradas y salidas apropiadas pueden incluir una boquilla, un orificio, tubos, un conducto, etc. En algunos casos, las entradas y/o salidas pueden incluir una estructura con válvula que se abre y se cierra cuando se desee para controlar el flujo de entrada y flujo de salida de material. Además, la cámara de proceso y el depósito no están limitados en el número y ubicación de entradas/salidas. Por ejemplo, la cámara de proceso y/o el depósito pueden tener una entrada o salida adicional para el flujo de material de muestra a otras ubicaciones adecuadas además de los conductos 130, 140.

Puede proporcionarse cualquier fuerza motriz adecuada para provocar el movimiento de material de muestra entre el depósito y la cámara de proceso (por ejemplo, a través de los conductos 130, 140 y entradas/salidas respectivas). En algunas realizaciones, se proporciona una bomba 150 para aplicar presión al material de muestra para desplazar el material de muestra desde el depósito hasta la cámara de proceso y al contrario. Puede utilizarse cualquier dispositivo de bombeo apropiado. En algunos casos, la bomba se acopla a un conducto, tal como el acoplamiento mostrado en la figura 3 entre el conducto 140 y la bomba 150. Puede proporcionarse una o más bombas adecuadas en cualquier ubicación apropiada del sistema. En algunas realizaciones, sin necesidad de un dispositivo de bombeo, se proporciona un gradiente de presión diferencial entre diversas regiones del sistema. Por ejemplo, puede mantenerse un gradiente de presión a lo largo del conducto 130 para provocar el flujo de material de muestra desde el depósito a través de la salida de depósito 122 y al interior de la cámara de proceso por medio de la entrada de cámara 112. De manera similar, también puede mantenerse un gradiente de presión a lo largo del conducto 140 que provoca un flujo de material de muestra desde la cámara de proceso a través de la salida de cámara 114 a través del conducto 140 y al interior del depósito por medio de la entrada de depósito 124.

La figura 4 muestra otra realización ilustrativa de un sistema de procesamiento acústico enfocado 200 que permite el tratamiento acústico enfocado a gran escala de material de muestra. Este sistema proporciona un único paso del material de muestra a través de la cámara de proceso. El sistema incluye un primer depósito 220 para contener un suministro de material de muestra que va a tratarse, una cámara de proceso 210 que proporciona un espacio para que el material de muestra experimente tratamiento acústico y un segundo depósito 230 para recibir material de muestra que ya se ha tratado. El primer depósito 220 incluye una salida de depósito 222 para permitir el flujo de salida de material de muestra desde el depósito al interior del conducto 240 y a lo largo de la dirección de la flecha E. La cámara de proceso 210 incluye una entrada de cámara 212 para permitir el flujo de entrada del material de muestra al interior de la cámara de proceso. Durante el tratamiento, el transductor acústico 202 crea ondas acústicas 204 para formar una zona focal 206 adecuada a la que se expone el material de muestra. Cuando el material de muestra se trata suficientemente, puede salir una cantidad adecuada de material de muestra de la cámara de proceso a través de la salida de cámara 214 y al interior de un conducto 250 para trasladarse a lo largo de la dirección de la flecha F y al interior del segundo depósito 230 por medio de la entrada de depósito 232. Aunque una mayor cantidad de material de muestra puede tratarse acústicamente en este sistema que la cantidad de material de muestra definida simplemente por el volumen de la cámara de proceso, el flujo de material de muestra no es de naturaleza cíclica, tal como se proporciona en la figura 3. Además, aparte del volumen de los depósitos 220, 230, no hay ningún límite en la cantidad de material de muestra que puede tratarse por medio del flujo a través de la cámara de proceso 210. Tal como se describió anteriormente, el depósito 220 puede servir como una fuente continua de

material de muestra que va a tratarse y el depósito 230 puede funcionar como drenaje continuo de material de muestra que ya se ha tratado.

Similar a lo descrito anteriormente con respecto a la figura 3, puede proporcionarse cualquier fuerza motriz adecuada para hacer que el material de muestra se desplace desde el primer depósito 220 hasta la cámara de proceso 210 y desde la cámara de proceso hasta el segundo depósito 230. En algunas realizaciones, se proporciona una bomba 260 para forzar al material de muestra a desplazarse a través del sistema de procesamiento acústico enfocado. Tal como se muestra en la figura 4, y sin limitación, la bomba 260 puede acoplarse a un conducto, por ejemplo y sin limitación, el conducto 250 y hacerse funcionar apropiadamente.

La figura 5 representa una realización ilustrativa de un sistema de procesamiento acústico enfocado 300 que proporciona un tratamiento acústico enfocado a gran escala de material de muestra en donde se emplean múltiples cámaras de procesamiento. El sistema ilustrado permite que pase material de muestra a través de cada cámara de procesamiento donde el material de muestra puede someterse a condiciones de procesamiento acústico enfocado similares o diferentes. Además, pueden añadirse o retirarse porciones de material de muestra entre las cámaras de procesamiento, según se desee.

Un depósito 330 contiene un suministro de material de muestra que va a tratarse en una primera cámara de proceso 310 y una segunda cámara de proceso 320 que proporcionan cada una espacio para que el material de muestra experimente tratamiento acústico enfocado. El depósito 330 incluye una salida de depósito 332 para permitir el flujo de salida de material de muestra desde el depósito al interior del conducto 340 y a lo largo de la dirección de la flecha G. La cámara de proceso 310 incluye una entrada de cámara 312 para permitir el flujo de entrada del material de muestra al interior de la cámara de proceso. Durante el tratamiento acústico, el transductor 302 proporciona ondas acústicas 304 para formar una zona focal 306 apropiada a la que se expone el material de muestra. Tras un tratamiento acústico suficiente del material de muestra, puede salir una cantidad adecuada de material de muestra de la cámara de proceso a través de la salida de cámara 314 y al interior de un conducto 350. El material de muestra puede trasladarse a lo largo de la dirección de la flecha I y finalmente entrar en la segunda cámara de proceso 320 por medio de la entrada de cámara 322. El material de muestra puede experimentar tratamiento acústico adicional dentro del espacio definido por la segunda cámara de proceso 320 en condiciones de tratamiento iguales o diferentes que las de la primera cámara de proceso 310. El transductor 303 crea ondas acústicas 305 para la formación de una zona focal 307 adecuada que es útil para el procesamiento acústico del material de muestra. Tras el tratamiento acústico adecuado, el material de muestra puede fluir fuera de la segunda cámara de proceso 320 por medio de la salida de cámara 324 y al interior del conducto 360 para el movimiento a lo largo de la dirección de la flecha K para su recogida en el drenaje 362 (por ejemplo, depósito con volumen limitado, recogida drenada de manera continua del material de muestra tratado, etc.).

En algunas realizaciones, y tal como se muestra en la figura 5, se proporciona una bomba 380 para proporcionar fuerza motriz para provocar el movimiento del material de muestra a través del sistema de procesamiento acústico enfocado. Aunque la bomba 380 se representa acoplada al conducto 340, puede apreciarse que cualquier bomba adecuada puede acoplarse al sistema de procesamiento acústico enfocado en cualquier ubicación apropiada.

Los conductos 370, 372 pueden proporcionarse en ubicaciones apropiadas en el sistema para permitir que se añada y/o retire material de muestra según sea necesario. Por ejemplo, a medida que el material de muestra se desplaza a lo largo del conducto 340 hacia la primera cámara de proceso 310, el conducto 370 puede proporcionar un componente añadido (por ejemplo, un fármaco, tensioactivo portador, coformador, solubilizante, estabilizador, etc.) que va a procesarse acústicamente en la cámara de proceso 310 junto con el material de muestra. De manera similar, el conducto 372 también puede retirar y/o proporcionar un componente adicional que puede procesarse acústicamente junto con el material de muestra en la cámara de proceso 320. La dirección de las flechas H, J son para ilustrar que los conductos 370, 372 pueden utilizarse para añadir o retirar material, según sea apropiado. Puede apreciarse que cualquier sistema de procesamiento acústico enfocado puede proporcionar, según sea apropiado, determinadas ubicaciones donde puede complementarse material de muestra con un componente adicional o donde puede retirarse una porción de material de muestra del sistema de procesamiento.

En algunas realizaciones, los sistemas de procesamiento acústico enfocado descritos en el presente documento pueden incorporar un sistema de control por retroalimentación adecuado para detectar características del tratamiento acústico de muestras y ajustar parámetros del sistema basándose en las características detectadas. Por ejemplo, pueden monitorizarse determinadas características del material de muestra, tales como por ejemplo, el nivel de cristalinidad dentro del material de muestra, la distribución de tamaño de partícula del material de muestra, el tamaño de partícula promedio dentro del material de muestra, el volumen del material de muestra en diversas ubicaciones a lo largo del sistema de procesamiento, la velocidad a la que el material de muestra se desplaza a través del sistema, y/o cualquier otra característica adecuada.

Por ejemplo, tras experimentar tratamiento acústico a través de la primera de dos cámaras de proceso, el sistema puede detectar que el nivel de cristalinidad en el material de muestra no es suficiente en ese punto como para dar lugar a una emisión de producto estable. Como resultado, el tratamiento acústico del material de muestra en la segunda cámara de proceso puede ajustarse en consecuencia (por ejemplo, el tratamiento podría prolongarse, los

ciclos por estallido de la acústica enfocada pueden ajustarse, la emisión de potencia del transductor puede aumentarse, la temperatura de la siguiente cámara de proceso puede ajustarse, etc.). En otro ejemplo, puede desearse que la velocidad de crecimiento cristalino de partículas dentro de un material de muestra deba estar por encima de una determinada cantidad y se determina (por ejemplo, mediante un ordenador o un usuario que monitoriza la velocidad de crecimiento cristalino dentro de la muestra) que la velocidad de crecimiento cristalino de partículas del material de muestra está por debajo de la velocidad preferida en ese punto durante el tratamiento. Por consiguiente, los parámetros del proceso pueden ajustarse en consecuencia para someter el material de muestra a una emisión pulsada/de potencia aumentada o un periodo de tratamiento prolongado que da como resultado un aumento general en la velocidad de crecimiento cristalino de partículas nanocristalinas dentro del material de muestra. Alternativamente, puede determinarse que se proporciona una cantidad insuficiente de material de simiente de cristal o coformador en el material de muestra como para formar adecuadamente una composición nanocristalina preferida. Como tal, puede inyectarse coformador adicional en el material de muestra (por ejemplo, a través de los conductos 370, 372) o pueden incluirse otras etapas de procesamiento previo de modo que puedan formarse apropiadamente nanocristales. También pueden monitorizarse otras características del material de muestra, dando como resultado ajustes adecuados en los parámetros de procesamiento.

En algunas realizaciones, los métodos usados para preparar composiciones nanocristalinas usando acústica enfocada pueden incluir un transductor que produce una zona focal de conformación lineal. La figura 6 representa un esquema de una realización ilustrativa de un sistema que tiene una cámara de proceso 710 alargada que está situada de maneja que el material de muestra 730 puede exponerse adecuadamente a la zona focal de conformación lineal a medida que la muestra fluye a través de la cámara de proceso. En algunas realizaciones, la cámara de proceso 710 puede ser un conducto a través del cual puede fluir la muestra desde una región de un recipiente del sistema hasta otra. Por ejemplo, una cámara de proceso alargada puede tener una razón de aspecto mayor de 2, mayor de 5 o mayor de 10.

Las zonas focales de conformación lineal pueden tener razones de aspecto grandes. Por ejemplo, una anchura de una zona focal de conformación lineal a lo largo de la dimensión de tamaño más corta de la zona focal puede ser menor de 2 cm, menor de 1 cm o menor de 1 mm. Sin embargo, una longitud de la zona focal de conformación lineal a lo largo de la dimensión de tamaño más larga de la zona focal puede ser mucho mayor de 2 cm, por ejemplo, mayor de 5 cm, mayor de 10 cm, mayor de 20 cm, etc. En algunas realizaciones, una zona focal de conformación lineal tiene una razón de aspecto mayor de 2, mayor de 5 o mayor de 10. Los sistemas acústicos adecuados para producir ejemplos de zonas focales de conformación lineal descritas en el presente documento incluyen los sistemas acústicos de serie L (L8, LE220) producidos por Covaris, Inc.

Por consiguiente, el material de muestra 730 se expone al campo acústico enfocado generado a partir del transductor 710 a medida que la muestra fluye desde un extremo de la cámara de proceso alargada hasta el otro extremo. En algunas realizaciones, una cámara de proceso alargada y un transductor acústico adecuado para generar una zona focal de conformación lineal pueden ser preferibles en situaciones en las que la velocidad de flujo a través de la cámara de proceso es alta. Por tanto, la muestra puede someterse a una exposición constante a la zona focal a pesar del movimiento rápido a través del conducto de cámara de proceso alargada. La cámara de proceso alargada y, por tanto, la zona focal de conformación lineal pueden disponerse en cualquier dirección adecuada, por ejemplo, vertical u horizontal, dependiendo de la dirección preferida de flujo de muestra.

La muestra puede fluir a través del sistema a cualquier velocidad de flujo adecuada. En algunas realizaciones, la velocidad de flujo de la muestra a través de cualquier porción del sistema, incluyendo una o más cámaras de proceso puede ser de al menos 0,1 ml/min, entre aproximadamente 0,5 ml/min y aproximadamente 100 ml/min, o entre aproximadamente 1 ml/min y aproximadamente 10 ml/min.

Los materiales de muestra descritos en el presente documento pueden incluir varias composiciones, por ejemplo, en forma de un precursor para una composición nanocristalina, o el material de muestra puede ser la propia composición nanocristalina. En algunos casos, uno o más de los materiales dentro de una muestra o composición nanocristalina puede ser cualquier producto farmacéutico, nutracéutico, cosmeceútico apropiado o combinación de los mismos. En una realización, un tratamiento previo de material de muestra puede incluir formar un fármaco amorfo solubilizado que puede incluir o no un coformador de fármaco, tal como un material de simiente para la cristalización del fármaco. En algunas realizaciones, puede incluirse un coformador junto con el agente activo en la formación de un compuesto o disposición más grande en la que el fármaco cristaliza con el coformador tras la exposición a una cantidad adecuada del campo acústico enfocado.

En algunas realizaciones, puede prepararse un material cristalino suficientemente puro como para su uso en aplicaciones farmacéuticas formando una muestra que incluye una disolución saturada del material que va a cristalizarse, ajustando opcionalmente la temperatura de la muestra de modo que la disolución se vuelva supersaturada y sometiendo la muestra a energía acústica enfocada adecuada.

Pueden usarse productos farmacéuticos como composición bioactiva en una muestra y pueden incluir, pero no se limitan a, moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM) (por ejemplo, tamoxifeno), agentes alquilantes (por ejemplo, compuestos de imidazol sustituidos tales como dacarbazina), compuestos de taxano (por

ejemplo, paclitaxel), un análogo nucleosídico (por ejemplo, gemcitabina), una estatina (por ejemplo, lovastatina, atorvastatina, simvastatina y similares), un análogo de pirimidina (por ejemplo, 5-fluorouracilo), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, ARNip, moléculas de interferencia por ARN, plásmidos, etc.), fármacos/medicamentos (por ejemplo, ibuprofeno, cinnarizina, indometacina, griseofulvina, felodipino, quercetina, corticosteroides, anticolinérgicos, péptidos/compuestos inhalables, insulina, interferones, calcitoninas, hormonas, analgésicos, codeína, fentanilo, morfina, antialérgicos, antibióticos, antihistamínicos, antiinflamatorios, broncodilatadores, adrenalina, etc.), y similares. Cuando sea apropiado, pueden usarse medicamentos que comprenden principios activos o fármacos en forma de sales (por ejemplo, como sales de metales alcalinos o aminas o como sales de adición de ácido) o como ésteres (por ejemplo, ésteres alquílicos inferiores) o como solvatos (por ejemplo, hidratos) para optimizar la actividad y/o estabilidad del medicamento. Puede incorporarse cualquier producto farmacéutico adecuado en las composiciones nanocristalinas descritas en el presente documento.

La muestra puede incluir cualquier composición adecuada distinta de un componente bioactivo. Por ejemplo, la muestra puede incluir un disolvente orgánico o inorgánico apropiado, estabilizador o similar. La concentración del componente bioactivo que va a cristalizarse dentro de la muestra puede variarse adecuadamente. En algunas realizaciones, la concentración de componente bioactivo que va a cristalizarse dentro de la muestra es mayor del 0,5% en volumen o de entre aproximadamente el 1% en volumen y aproximadamente el 10% en volumen.

En algunas realizaciones, exponer la muestra a la zona focal para inducir nanocristalización puede incluir procesar la muestra en un entorno isotérmico. La energía acústica enfocada aplicada a la muestra no tiene un grado significativo de energía dispersada aleatoriamente (es decir, en forma de calor), y de ese modo la temperatura de un material de muestra, en general, puede mantenerse dentro de un grado adecuado de variación. Por ejemplo, la temperatura de la muestra puede mantenerse a una temperatura dentro de aproximadamente 5°C, dentro de aproximadamente 2°C, o dentro de aproximadamente 1°C de una temperatura inicial.

Las composiciones nanocristalinas preparadas según los métodos descritos en el presente documento pueden tener cualquier distribución de tamaño de partícula adecuada. Aunque no se requiere, en algunas realizaciones, los sistemas y métodos descritos que implican el uso de energía acústica enfocada para preparar composiciones nanocristalinas dan como resultado una distribución de tamaño de partícula que es unimodal. Por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula puede ser similar a una distribución gaussiana. Sin embargo, en otros casos, la distribución de tamaño de partícula de composiciones nanocristalinas adecuadas es multimodal. En algunas realizaciones, el PDI de las distribuciones de tamaño de partícula de composiciones nanocristalinas tratadas acústicamente es menor de 0,5, menor de 0,3, menor de 0,1, menor de 0,08 o menor de 0,06. Por ejemplo, el PDI de las distribuciones de tamaño de partícula de composiciones nanocristalinas tratadas acústicamente de manera adecuada puede ser de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,1, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,09, o entre aproximadamente 0,06 y aproximadamente 0,08. En algunas realizaciones, la desviación estándar relativa de la distribución de tamaño de partícula de una composición nanocristalina tratada acústicamente puede ser menor del 1%, menor del 0,5%, o de entre el 0,1% y el 0,8% de un tamaño de partícula promedio de la composición nanocristalina.

Las composiciones nanocristalinas preparadas con sistemas y métodos que emplean acústica enfocada descritos en el presente documento pueden presentar tiempo de conservación largo sin degradación de la muestra (es decir, manteniendo la funcionalidad). En algunas realizaciones, el material procesado puede ser casi totalmente cristalino (es decir, de pocas a ninguna partícula amorfa). Como indicación de la cristalinidad de una composición nanocristalina, tras un determinado periodo de tiempo (por ejemplo, tras una hora), la distribución de tamaño de partícula de la composición nanocristalina puede ser generalmente estable. Es decir, hay una tendencia mínima a que partículas cristalinas pequeñas de la composición nanocristalina experimenten coalescencia para dar partículas más grandes a lo largo del tiempo. Las partículas amorfas, en cambio, pueden presentar una mayor tendencia a combinarse entre sí para dar partículas de tamaño grande.

En algunas realizaciones, tras permitir que una composición nanocristalina preferida repose durante 12 horas, 24 horas, 2 días, 5 días, 1 semana, 1 mes, 1 año, o más tiempo, el tamaño de partícula promedio y/o índice de polidispersidad de realizaciones de la nanoformulación fluctúa en no más del 2%, el 5% o menos del 10%. En algunas realizaciones, la distribución de tamaño deseada de las partículas formadas en una composición nanocristalina (por ejemplo, 100 nm, 1 micrómetro, 10 micrómetros, 50 micrómetros, que tienen un bajo PDI, etc.) puede mantenerse a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, tal como por ejemplo, entre 1 día y 24 meses, entre 2 semanas y 12 meses, o entre 2 meses y 5 meses.

Puede usarse acústica enfocada para potenciar la eficacia y conferir un amplio grado de conveniencia a la preparación de composiciones nanocristalinas. En algunas realizaciones, el tiempo de exposición de una muestra a un campo acústico enfocado que da como resultado una composición nanocristalina adecuada es corto. Por ejemplo, puede exponerse una muestra a un campo acústico enfocado para formar una composición nanocristalina adecuada durante un periodo de tiempo de menos de 5 horas, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos.

Los sistemas y métodos de uso de acústica enfocada para fomentar la formación nanocristalina según los aspectos presentados pueden implicar variar adecuadamente los ciclos por estallido del campo acústico enfocado, o el número de oscilaciones acústicas contenidas en cada estallido. En algunas realizaciones, los ciclos por estallido pueden cambiar entre 1000 ciclos por estallido y 6000 ciclos por estallido. Por ejemplo, en algunos casos, la velocidad de nucleación y el crecimiento cristalino de una muestra pueden aumentar tras aumentar los ciclos por estallido. En una realización, el tiempo de procesamiento para la cristalización de muestras a 200 ciclos por estallido puede ser de aproximadamente 50 minutos; aunque, tras aumentar los ciclos por estallido hasta 5000, el tiempo de procesamiento se redujo a 5 minutos. En diversas realizaciones, se hace funcionar un transductor acústico para generar un campo acústico enfocado que tiene más de 1000 ciclos por estallido, más de 2000 ciclos por estallido, más de 3000 ciclos por estallido, más de 4000 ciclos por estallido, más de 5000 ciclos por estallido o más de 6000 ciclos por estallido. En algunos casos, un campo acústico enfocado generado con una cantidad mayor de ciclos por estallido puede proporcionar la producción de una composición nanocristalina estable con una distribución de tamaño de partícula estrecha. En algunas realizaciones, un cambio en los ciclos por estallido podría no afectar sustancialmente al tiempo de procesamiento global para la muestra que va a cristalizarse de manera estable.

Los sistemas acústicos enfocados pueden funcionar a cualquier potencia adecuada para preparar composiciones nanocristalinas que tienen características preferidas. En algunas realizaciones, se hace funcionar un campo acústico enfocado a una potencia de entre 50 vatios y 300 vatios, entre 100 vatios y 250 vatios, entre 50 vatios y 150 vatios, o entre 200 vatios y 300 vatios.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar determinadas realizaciones de la presente invención, pero no deben interpretarse como limitativos y no ejemplifican el alcance completo de la invención.

Ejemplo 1

Se formaron nanopartículas cristalinas usando una muestra de 2 ml que incluía inicialmente 1 parte de DMA, 99 partes de estabilizador de PVP/SDS y felodipino. Se procesó la muestra usando una máquina Covaris S220, usando una temperatura del baño de agua de 18°C, un ciclo de trabajo del 50%, una potencia incidente máxima de 75 vatios (PIP), 1000 ciclos/estallido y un tiempo de tratamiento total de 20 minutos.

Este procesamiento dio como resultado la formación (crecimiento) de nanopartículas cristalinas en las que el 100% de las partículas eran parte de una distribución unimodal que tenía un tamaño promedio de aproximadamente 154,6 nm con un modo de 153,2. Se produjo un intervalo de tamaño estrecho de las partículas, con el PDI que se midió que era de 0,136. La figura 7 representa la distribución 400 de tamaño de partícula de la composición nanocristalina.

Ejemplo 2

Se preparó una muestra de 18 ml de nanopartículas cristalinas que incluía inicialmente 1 parte de DMA, 99 partes de estabilizador de PVP/SDS y felodipino. Se procesó la muestra usando una máquina Covaris S220, usando una temperatura del baño de agua de 15°C con un tiempo de tratamiento total de 5 minutos. Se hizo funcionar el sistema acústico enfocado a 5000 ciclos por estallido. En un ejemplo comparativo donde el sistema acústico enfocado se hizo funcionar a 200 ciclos por estallido, el tiempo de tratamiento total para la formación cristalina completa era de 50 minutos; en contraposición al ejemplo actual donde se produjo la formación cristalina completa en un tiempo de procesamiento de 5 minutos a 5000 ciclos por estallido.

Este ejemplo dio como resultado la formación de crecimiento cristalino de nanopartículas cristalinas que tenían una distribución bimodal con un pico dominante y un tamaño de partícula promedio de 257,3 inmediatamente después del procesamiento. La figura 8 muestra la distribución 410 de tamaño de partícula inmediatamente después del procesamiento que incluye un 94,4% de las partículas que tienen un modo de 244,4 nm y un 5,6% de las partículas que tienen un modo de 1,083 nm. Se midió que el PDI era de 0,138.

Entonces se permitió que la muestra procesada reposara durante 4 horas. La figura 9 representa la distribución 412 de tamaño de partícula después de este periodo de tiempo. El tamaño de partícula promedio resultante era de 246,3 nm y el modo del 100% de las partículas era de 257,1 nm. Se midió el PDI que era de 0,090.

Ejemplo 3

Se preparó una muestra de 100 ml de nanopartículas cristalinas usando una mezcla de muestra similar a la de los ejemplos 1 y 2. Sin embargo, se implementó un sistema de paso múltiple similar al mostrado en la figura 3 de modo que un gran volumen de muestra se procesaría cíclicamente durante 10 minutos. La velocidad de flujo era de 10 ml/min.

El procesamiento anterior dio como resultado la formación de crecimiento cristalino de nanopartículas cristalinas que

tenían una distribución bimodal con un pico dominante y un tamaño de partícula promedio de 306,0 inmediatamente después del procesamiento. La figura 10 muestra la distribución 420 de tamaño de partícula inmediatamente después del procesamiento que incluye un 97,1% de las partículas que tienen un modo de 327,7 nm y un 2,9% de las partículas que tienen un modo de 125,1 nm. Se midió el PDI que era de 0,087.

Entonces se permitió que la muestra procesada reposara durante 4 horas. La figura 11 representa la distribución 422 de tamaño de partícula después de este periodo de tiempo. El tamaño de partícula promedio resultante era de 301,5 nm. El modo del 95,3% de las partículas era de 257,1 nm y el modo del 4,7% de las partículas era de 115,2. Se midió el PDI que era de 0,129.

Ejemplo 4

Se preparó una muestra de 100 ml de nanopartículas cristalinas empleando una mezcla de muestra y un sistema de paso múltiple similares a los del ejemplo 3 anterior. El sistema de paso múltiple permitió que se procesara cíclicamente un gran volumen de muestra durante 20 minutos. La velocidad de flujo era de 5 ml/min.

El procesamiento anterior dio como resultado la formación de crecimiento cristalino de nanopartículas cristalinas que tenían una distribución unimodal que tenía un tamaño de partícula promedio de 441,0 aproximadamente 2 horas después del procesamiento. La figura 12 representa la distribución 430 de tamaño de partícula que muestra que el 100,0% de las partículas tienen un modo de 439,7 nm. Se midió el PDI que era de 0,048.

Se permitió que la muestra procesada reposara proporcionando 72 horas de tiempo de almacenamiento. La figura 13 representa la distribución 432 de tamaño de partícula 72 horas después del procesamiento. El tamaño de partícula promedio resultante era de 433,2 nm. El modo del 100,0% de las partículas era de 432,9 nm. Se midió el PDI que era de 0,097.

Ejemplo 5

Se preparó una muestra de 100 ml de nanopartículas cristalinas usando una mezcla de muestra similar a la de los ejemplos anteriores. Se empleó un sistema de un único paso similar al mostrado en la figura 4 que permite que un gran volumen de muestra se procese durante 10 minutos. La velocidad de flujo era de 5 ml/min.

Este procesamiento dio como resultado la formación de crecimiento cristalino de nanopartículas cristalinas que tenían una distribución unimodal que tenía un tamaño de partícula promedio de 592,3 inmediatamente después del procesamiento. La figura 14 representa la distribución 440 de tamaño de partícula que muestra que el 100,0% de las partículas tenían un modo de 577,0 nm. Se midió el PDI que era de 0,123.

Se permitió que la muestra procesada reposara durante 2 horas. La figura 15 representa la distribución 442 de tamaño de partícula 2 horas después del procesamiento. El tamaño de partícula promedio resultante era de 546,4 nm. El modo del 100,0% de las partículas era de 510,8 nm. Se midió el PDI que era de 0,158.

Realizaciones adicionales

Otras realizaciones descritas a continuación se refieren al uso de acústica enfocada para tratar material que fluye por o a través de una zona de procesamiento y puede emplearse en combinación adecuada con aspectos que incluyen la formación reproducible de grandes volúmenes de partículas nanocristalinas a través del crecimiento cristalino, presentados en el presente documento.

Los sistemas y métodos se refieren a ampliar a escala un proceso utilizando energía acústica enfocada para flujos de procesos continuos y discontinuos de mayor volumen, de manera que el resultado deseado del tratamiento acústico pueda lograrse en volúmenes de muestra mayores. El resultado deseado del tratamiento acústico, que puede lograrse o potenciarse mediante el uso de trenes de ondas ultrasónicas, puede ser sin limitación, provocar el crecimiento cristalino en la muestra (es decir, crear sitios de nucleación y/o aumentar el crecimiento cristalino), calentar la muestra, enfriar la muestra, fluidizar la muestra, micronizar la muestra, mezclar la muestra, agitar la muestra, alterar la muestra, permeabilizar un componente de la muestra, formar una nanoemulsión o nanoformulación, potenciar una reacción en la muestra, solubilizar, esterilizar la muestra, lisar, extraer, triturar, catalizar y degradar selectivamente al menos una porción de una muestra. Las ondas sónicas también pueden potenciar la filtración, el flujo de fluido en conductos y la fluidización de suspensiones. Los procedimientos de la presente divulgación pueden ser sintéticos, analíticos o simplemente facilitadores de otros procedimientos tales como agitación.

Por ejemplo, alterar la permeabilidad o accesibilidad de un material de una manera controlada puede permitir la manipulación del material al tiempo que se conserva la viabilidad y/o actividad biológica del material. En otro ejemplo, mezclar materiales o modular el transporte de un componente dentro o fuera de los materiales, de una manera reproducible, uniforme y automatizada, puede ser beneficioso. Según una realización del sistema, el control del procesamiento de muestras incluye un bucle de retroalimentación para regular al menos uno de ubicación de la

energía sónica, patrón de pulsos, intensidad de pulsos, duración y dosis absorbida del ultrasonido para lograr el resultado deseado de tratamiento acústico. En una realización, la energía ultrasónica está en el intervalo de frecuencia de megahercios (MHz), en contraposición al procesamiento sónico clásico que emplea normalmente energía ultrasónica en el intervalo de frecuencia de kilohercios (kHz).

En sistemas anteriores, cuando se desenfocan, y la energía ultrasónica no controlada interacciona con un sistema químico o biológico complejo, el campo acústico a menudo se distorsiona, se refleja y se desenfoca. El efecto neto es que la distribución de energía se vuelve no uniforme y/o desenfocada en comparación con el aporte. Condiciones de reacción no uniformes pueden limitar las aplicaciones de reacción a procesos no críticos, tales como tratamiento de fluido global donde los gradientes de temperatura dentro de una muestra no tienen importancia. Sin embargo, algunos de los aspectos no uniformes son altamente perjudiciales para las muestras, tales como gradientes de temperatura extremos que dañan la integridad de la muestra. Por ejemplo, en algunos casos, las altas temperaturas generadas desnaturalizarían irreversiblemente las proteínas diana. Como otro ejemplo, cuando se aplica ultrasonido controlado de manera inapropiada a una disolución de muestra biológica global, tal como para la extracción de constituyentes intracelulares del tejido, el tratamiento provoca una mezcla compleja, heterogénea de subcontenimientos que varían durante el transcurso de una dosis de tratamiento. Por ejemplo, la energía puede desplazar espacialmente un resto diana y desviar la diana fuera de la zona de energía óptima. Adicional o alternativamente, la energía puede dar como resultado interferencia que refleja la energía acústica. Por ejemplo, se produce una "pantalla de burbujas" cuando un frente de ondas de energía sónica crea burbujas de cavitación que persisten hasta que llega el siguiente frente de ondas, de manera que la energía del segundo frente de ondas se bloquea al menos parcialmente y/o se refleja por las burbujas. Todavía adicionalmente, partículas más grandes en la muestra pueden desplazarse a nodos de baja energía, dejando de ese modo a las partículas más pequeñas en la muestra más tiempo de residencia en los nodos de alta energía. Además, la viscosidad, temperatura y uniformidad de la muestra pueden variar durante el proceso ultrasónico, dando como resultado gradientes de estos parámetros durante el procesamiento. Por consiguiente, los procesos actuales son generalmente aleatorios y no uniformes, especialmente cuando se aplican a aplicaciones *in vitro*, tales como permeabilización de membrana, dificultando el uso de ultrasonidos en aplicaciones de alto rendimiento donde se requiere la estandarización del tratamiento de una muestra a la siguiente. Como consecuencia, muchas aplicaciones potenciales de los ultrasonidos, especialmente aplicaciones biológicas, se limitan a aplicaciones específicas, altamente especializadas, tales como litotripsia y obtención de imágenes de diagnóstico, debido a los aspectos potencialmente no deseados e incontrolables de los ultrasonidos en sistemas complejos.

El uso de energía acústica enfocada, tal como se describe en la patente estadounidense 7.521.023 (que se incorpora el presente documento por referencia en su totalidad) y otras, puede superar estas limitaciones, y se dan a conocer métodos para el tratamiento acústico de una muestra en un recipiente cerrado. El procesamiento de volúmenes de material de muestra mayores que los de un único recipiente puede lograrse mediante la transferencia del material al interior de, y fuera de una "cámara de reacción" o "zona de proceso" acústica enfocada. El material puede residir en la zona de procesamiento hasta que se logra el resultado deseado (único paso), y luego se transfiere a etapas de proceso posteriores, o se captura como producto terminado.

Los aspectos de la presente invención abordan el problema de ampliar a escala la aplicación de energía ultrasónica enfocada para tratar mayores volúmenes de material, incluyendo procesos continuos así como procesamiento a escala discontinua, y proporcionan aparatos y métodos para el tratamiento sin contacto de muestras con energía ultrasónica usando un haz enfocado de energía. La frecuencia del haz puede ser variable, puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz, más preferiblemente de 500 kHz a 10 MHz, y puede enfocarse en una zona de procesamiento de aproximadamente 10 mm a 20 mm (y posiblemente de mayor tamaño con aumentos de energía), pasando el material de muestra a través de esta zona para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, algunas realizaciones de la presente invención pueden tratar muestras con energía ultrasónica al tiempo que se controla la temperatura de la muestra, mediante el uso de trenes de ondas complejos generados por ordenador, que pueden controlarse adicionalmente mediante el uso de retroalimentación a partir de un sensor. La señal de emisión acústica, o tren de ondas, puede variar en cualquiera o todos de frecuencia, intensidad, ciclo de trabajo, patrón de estallidos y conformación de pulsos. Además, este tratamiento puede emprenderse automáticamente bajo control informático, y también puede vincularse a retroalimentación por medición e instrumentación a partir de la corriente de emisión o global. En otro ejemplo, algunas realizaciones de la presente invención pueden tratar muestras con energía ultrasónica mediante el movimiento relativo de la muestra y el foco del haz, en cualquiera o todas de dos o tres dimensiones, para garantizar el mezclado completo y meticuloso dentro de la zona de procesamiento.

En algunas realizaciones, el material puede procesarse en una cámara que se sella y tiene una o más entradas y salidas a la cámara para la transferencia eficaz del material de fluido global a través de la cámara. La cámara puede sellarse durante el tratamiento para impedir la contaminación del material de muestra o del entorno. En algunas realizaciones, pueden usarse matrices de cámaras para el procesamiento de múltiples corrientes de muestra en paralelo, en donde son necesarios volúmenes de muestra muy grandes, tal como en corrientes de procesos de fabricación. En algunas realizaciones, las cámaras y/u otros componentes que entran en contacto con un material procesado pueden estar hechos de una forma desechable, por ejemplo, para su uso una sola vez en el procesamiento de un material y desecharse después de eso.

El recipiente de la muestra puede ser una cámara compuesta por una o más piezas y puede incluir una “ventana” acústica a través de la cual pasa la energía sónica. Esta ventana puede estar hecha de una variedad de materiales para optimizar el efecto deseado, y pueden incluir vidrio, polímeros de película delgada tales como poliimida, otros polímeros moldeables, cuarzo, zafiro y otros materiales. La cámara puede tener una o más entradas y una o más salidas para la transferencia de material dentro o fuera de la cámara. La velocidad a la que se transfiere el material a través de la cámara puede controlarse de manera activa por medio de un sistema de bombeo, tal como una bomba peristáltica, de engranajes u otra, o de manera pasiva por medio de métodos de alimentación por gravedad tales como cambios de elevación o inclinación de una cámara a través de una oscilación alrededor de su eje. El aparato puede incluir también un material transparente acústicamente dispuesto entre la fuente de energía sónica y el soporte. La fuente de energía sónica puede generar energía sónica a dos o más frecuencias diferentes, opcionalmente en forma de un tren de ondas en serie. El tren de ondas puede incluir una primera componente de ondas y una segunda componente de ondas diferente. Alternativa o adicionalmente, el tren de ondas puede incluir aproximadamente 1000 ciclos por estallido a aproximadamente un ciclo de trabajo del 10% a aproximadamente una amplitud de 500 mV.

En una realización ilustrativa, un sistema para tratar un material con energía acústica incluye una cámara que define un volumen interno y que tiene una abertura al interior del volumen interno. Una entrada está dispuesta para proporcionar un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida está dispuesta para descargar un flujo de salida de material desde el volumen interno. En algunas disposiciones, la entrada y/o salida pueden tener una válvula de contención o estar dispuestas de otra forma para ayudar en la influencia del flujo en el volumen interno, por ejemplo, ayudar a garantizar que el flujo, aunque potencialmente intermitente, se mantenga en una dirección desde la entrada hasta la salida. Una ventana puede estar dispuesta en la abertura de la cámara para cerrar de manera sellada la abertura y transmitir energía acústica enfocada al interior de la cámara para el tratamiento del material en el volumen interno. La ventana puede ser generalmente transparente a la energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz. De este modo, la ventana puede impedir mínimamente que la energía acústica se traslade al interior del volumen interno. En algunas disposiciones, la ventana puede ayudar a dirigir la energía acústica, por ejemplo, la ventana puede tener una cara convexa u otra disposición que tiene un efecto de enfoque o lente sobre la energía acústica. Una fuente de energía acústica, tal como uno o más transductores piezoeléctricos, puede estar separada de la ventana y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno. El sistema puede estar dispuesto para alojar el tratamiento acústico continuo de material en la cámara durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, durante 1 hora o más, a una intensidad relativamente alta, por ejemplo, a una emisión del transductor acústico de 200 vatios o más, sin experimentar acumulación de calor excesiva u otros problemas. (En un tratamiento acústico continuo, puede hacerse que el material fluya de un modo continuo en una cámara, o puede fluir de un modo intermitente. Además, la fuente de energía acústica puede funcionar a un nivel de potencia que varía, pero en una base promedio de tiempo funciona a un nivel de emisión de potencia relativamente alta, por ejemplo, 200 vatios o más). Esto es en contraposición a disposiciones de tratamiento acústico anteriores en las que el tratamiento acústico continuo durante 1 hora o más podría no haberse logrado por una variedad de diferentes motivos, tales como acumulación de calor excesiva, fallo de la fuente acústica, daño al material de muestra, y así sucesivamente.

En algunas disposiciones, el volumen interno puede dimensionarse adecuadamente o disponerse de otra forma para ayudar a exponer el material en el volumen interno a la energía acústica. Por ejemplo, el volumen interno puede incluir paredes que están ubicadas cerca de los límites de una zona focal acústica en la cámara interna para ayudar a garantizar que el material se mantiene en o cerca de la zona focal durante el tratamiento. En otras disposiciones, el volumen interno puede incluir elementos que proporcionan puntos de nucleación para la cavitación u otros efectos provocados acústicamente. Un medio de acoplamiento, que puede ser líquido o sólido, puede estar dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta la ventana. Por ejemplo, puede estar situado un baño de agua entre la fuente de energía acústica y la ventana de la cámara. En algunas disposiciones, la cámara puede estar parcial o completamente sumergida en un medio de acoplamiento líquido, tal como agua.

En una realización ilustrativa, la cámara y la ventana pueden estar dispuestas para mantener un entorno presurizado en el volumen interno. Proporcionar una presión adecuada en el volumen interno puede ayudar a potenciar las velocidades de reacción, puede ayudar a reducir la cavitación, o proporcionar otros efectos deseables en el tratamiento acústico. La cámara puede incluir una segunda ventana, por ejemplo, sobre una superficie superior de la cámara opuesta a la ventana, que permite la inspección visual de la cámara interna. Por ejemplo, un sensor, tal como una cámara de video u otro sensor óptico, puede capturar imágenes de la cámara interna durante el tratamiento. Los datos de imágenes pueden usarse para controlar el funcionamiento del sistema, tal como las velocidades de flujo del material, las propiedades de energía acústica, etc., para lograr resultados deseados. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de análisis de imágenes sobre los datos de imágenes para detectar características del tratamiento, tales como el tamaño o la presencia de burbujas de cavitación, las velocidades de flujo del material, las velocidades de mezclado, etc., y/o características del material, tales como tamaño de partícula, homogeneización, fluidización, etc., que se usan para controlar la fuente acústica u otros aspectos del sistema.

En una realización, la cámara puede incluir un intercambiador de calor en una superficie externa dispuesto para

intercambiar calor con el medio de acoplamiento. Por ejemplo, el intercambiador de calor puede incluir una pluralidad de aletas radiales, varillas, rebajes, cavidades u otras características que ayudan a transferir calor con respecto al volumen interno de la cámara. En algunas disposiciones, puede transferirse calor al interior del volumen interno, mientras que en otras disposiciones, puede transferirse calor fuera del volumen interno, al menos en parte, mediante el intercambiador de calor. Una temperatura de un medio de acoplamiento, ya sea el medio de acoplamiento acústico u otro medio de acoplamiento térmico, puede controlarse para afectar a la transferencia de calor deseada. Puede proporcionarse un calentador de resistencia eléctrica u otro generador de calor con la cámara para proporcionar una fuente de calor adicional, si se desea. En otra realización, el intercambiador de calor puede incluir una camisa de calentamiento o enfriamiento asociada con al menos una porción de la cámara para suministrar fluido de calentamiento/enfriamiento a una pared de la cámara. La camisa puede permitir que un medio de acoplamiento térmico entre en contacto con la cámara mientras que también mantiene el medio de acoplamiento térmico separado de un medio de acoplamiento acústico. Esta disposición puede ser útil, por ejemplo, cuando se usa un tipo particular de material (tal como agua) de la mejor manera para el acoplamiento acústico, mientras que se usa un material diferente (tal como una disolución de anticongelante) de la mejor manera para el acoplamiento térmico.

En una realización ilustrativa, la cámara puede tener una conformación de cilindro, y la entrada y salida pueden incluir cada una un conducto que se extiende lejos de la cámara a lo largo de un eje longitudinal de la conformación de cilindro. Por tanto, la cámara puede depender, en algún sentido, de la entrada y salida o puede estar situada de otra forma por debajo de los conductos de entrada y salida. La cámara puede usarse con un recipiente que tiene un volumen interno y una abertura a través de la cual puede hacerse pasar la cámara para que esté situada en el recipiente. La fuente de energía acústica también puede ubicarse en el recipiente junto con un medio de acoplamiento. Puede disponerse una tapa para cerrar la abertura del recipiente, por ejemplo, para encerrar la cámara en el recipiente. La entrada y salida pueden incluir cada una un conducto que se extiende lejos de la cámara y que pasa a través de la tapa de modo que puede introducirse material en la cámara incluso aunque el recipiente pueda estar completamente sellado de otra forma de un entorno externo.

En otra realización ilustrativa, la cámara puede incluir un elemento de inserción que define, al menos en parte, la conformación y el tamaño del volumen interno. El elemento de inserción, que puede incluir dos o más partes separadas o un único componente, puede proporcionarse en la cámara para servir para una cualquiera de varias funciones, tales como proporcionar una pluralidad de sitios de nucleación para la cavitación, proporcionar un catalizador u otros sitios para potenciar reacciones, definir el volumen interno para que tenga una conformación, un tamaño particulares u otra configuración, ayudar a transferir calor al interior/fuera del volumen interno, y así sucesivamente. Por ejemplo, el elemento de inserción puede definir el volumen interno para que tenga un tamaño y una conformación que coincide estrechamente o interacciona de otra forma con una zona focal de energía acústica en la cámara. El elemento de inserción puede estar hecho de cualquier material adecuado, tal como un material cerámico, puede incluir componentes de cualquier tamaño o conformación adecuado, tal como una pluralidad de elementos de varilla, o tener otras características deseadas.

En otro aspecto de la invención, un sistema para tratar acústicamente un material incluye una cámara que define un volumen interno y que tiene una entrada para proporcionar un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno. Una fuente de energía acústica puede estar separada de la cámara y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno, por ejemplo, para tratar material en el volumen interno. Un medio de acoplamiento, que puede ser líquido o sólido, puede estar dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta la cámara. Un depósito puede contener un material que va a tratarse mediante energía acústica en la cámara, y un agitador puede estar dispuesto para mezclar o mover de otra forma el material dentro del depósito. Un conducto de suministro conectado de manera fluida entre el depósito y la entrada de la cámara puede suministrar material desde el depósito hasta la cámara, y un conducto de retorno conectado de manera fluida entre el depósito y la salida de la cámara puede devolver el material al depósito. En algunas realizaciones, una bomba puede estar dispuesta para hacer que el material fluya a través de los conductos de suministro y retorno, y puede proporcionarse un segundo depósito que recibe opcionalmente material del conducto de retorno. Por ejemplo, el conducto de retorno puede incluir una válvula de tres vías u otra disposición que permita que el material se dirija al segundo depósito en vez de devolverse al primer depósito.

En otro aspecto de la invención, un sistema para tratar acústicamente un material incluye una cámara que define un volumen interno y que tiene una entrada para proporcionar un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno. Una fuente de energía acústica puede estar separada de la cámara y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno, por ejemplo, para tratar el material en la cámara. Un medio de acoplamiento puede estar dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta la cámara. Un primer conducto puede estar conectado de manera fluida a la entrada de la cámara, y un segundo conducto puede estar conectado de manera fluida a la salida de la cámara de modo que se hace que el material en los conductos fluya en una primera dirección desde el primer conducto a través del volumen interno y al interior del segundo conducto, y posteriormente que fluya en una

segunda dirección desde el segundo conducto a través del volumen interno y al interior del primer conducto. Puede provocarse el flujo del material mediante una bomba, gravedad u otra fuerza motriz, y los conductos primero y/o segundo pueden estar conectados a un depósito respectivo que sirve para contener el material según sea necesario.

En otro aspecto de la invención, un sistema para tratar acústicamente un material puede incluir conjuntos de tratamiento acústico primero y segundo que están dispuestos en serie. Es decir, puede tratarse el material en una primera cámara, y luego suministrarse para su tratamiento posterior en una segunda cámara. Cada uno de los conjuntos de tratamiento puede incluir una cámara que define un volumen interno y que tiene una entrada para recibir un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno, una fuente de energía acústica separada de la cámara y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno, y un medio de acoplamiento dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta la cámara. Un depósito puede estar dispuesto para contener un material que va a tratarse mediante energía acústica en las cámaras de los conjuntos de tratamiento acústico primero y segundo, y un conducto de suministro puede estar conectado de manera fluida entre el depósito y la entrada del primer conjunto de tratamiento. Un conducto de transferencia puede estar conectado de manera fluida entre la salida del primer conjunto de tratamiento y la entrada del segundo conjunto de tratamiento, por ejemplo, para transferir material desde la primera cámara hasta la segunda cámara.

Aparato y métodos para tratamiento ultrasónico

Las figuras 16 y 17 representan una realización de una cámara de procesamiento 10, donde la energía acústica enfocada generada por una fuente de energía acústica 2 pasa a través de una ventana acústica 11 de la cámara y al interior de un volumen interno 12 de la cámara 10 donde está ubicado el material de muestra. Tal como se comenta en más detalle a continuación, el sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir un controlador 20 (por ejemplo, que incluye un ordenador de propósito general programado adecuadamente u otro dispositivo de procesamiento de datos) que recibe información de control (por ejemplo, de uno o más sensores, dispositivos de entrada por el usuario, etc.) y controla de forma correspondiente el funcionamiento de la fuente de energía acústica 2 y/u otros componentes del sistema. Se proporciona material de muestra dentro del volumen interno 12 por medio de una entrada 13 y se retira del volumen 12 por medio de una salida 14. La entrada y salida pueden estar dispuestas en una variedad de modos, y en esta realización la entrada 13 y salida 14 incluyen cada una un conducto acoplado a la cámara 10. En algunas realizaciones, la entrada y/o salida pueden incluir una válvula de contención, una válvula de una vía, válvulas controladas electrónicamente u otra disposición que ayuda a garantizar que se produzca el flujo de un modo deseado, por ejemplo, de modo que el flujo de material es siempre desde la entrada hasta la salida incluso aunque el flujo pueda ser intermitente. El volumen interno 12 puede estar dimensionado y conformado según sea apropiado para el material que va a tratarse, por ejemplo, algunas aplicaciones de tratamiento acústico (tales como esterilización) pueden funcionar más eficazmente si se trata un volumen relativamente pequeño de material en un volumen relativamente pequeño, mientras que otras aplicaciones (tales como mezclado) pueden producir mejores resultados usando un mayor volumen para el volumen interno 12. El volumen interno 12 puede tener diferentes conformaciones u otras características de configuración, por ejemplo, el volumen interno 12 puede estar definido por paredes verticales, puede tener una conformación cónica, puede tener una conformación curvada, y así sucesivamente. Además, la cámara 10 puede estar hecha de múltiples componentes tales como un elemento superior, elemento transparente acústicamente y un cuerpo que juntos definen el volumen interno que contiene el material que va a tratarse. Alternativamente, la cámara 10 puede estar hecha como una única pieza unitaria o de otros modos.

Una o más paredes de la cámara 10 pueden servir como, o estar asociadas de otra forma con, un mecanismo de transferencia térmica, o intercambiador de calor, para disipar cualquier calor generado en el volumen interno 12 y/o para recibir calor desde el exterior de la cámara 10 que se transfiere al interior del volumen interno 12. Tal como puede observarse en la figura 16, la cámara 10 puede incluir un intercambiador de calor 515 en forma de una pluralidad de aletas radiales. Por supuesto, el intercambiador de calor 515 podría estar formado de otros modos, tales como incluir un dispositivo de Peltier que usa potencia eléctrica para transferir calor desde una ubicación hasta otra, un calentador de resistencia eléctrica, varillas, tubos u otras estructuras conductoras de calor, materiales de cambio de fase usados para transferir calor desde una ubicación hasta otra, y así sucesivamente. El intercambiador de calor 515 puede estar dispuesto para funcionar con cualquier medio de acoplamiento térmico adecuado, tal como aire u otro gas, agua u otro líquido, o un material sólido. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 17, la cámara 10 puede estar completa o parcialmente sumergida en un líquido que sirve para transmitir calor con respecto al intercambiador de calor 515. El acoplamiento térmico cercano entre el agua u otro medio de acoplamiento térmico exterior y el volumen interno 12 puede ayudar a controlar la temperatura del material en el volumen interno 12 durante el procesamiento acústico. El control de la temperatura del medio de acoplamiento 4 puede ayudar a controlar la temperatura en el volumen interno 12. Por ejemplo, el medio de acoplamiento 4 puede recircularse a través de un enfriador, un calentador, u otro medio para ajustar la temperatura del medio de acoplamiento 4. Por tanto, el material de muestra dentro de la cámara 10 puede vincularse térmicamente a la temperatura del medio de acoplamiento 4 mediante la consideración cuidadosa del diseño de la cámara 10. El acoplamiento térmico entre la pared interior de la cámara 10 y el material de muestra puede vincularse fuertemente, debido a alto mezclado, turbulencia y actividad/o en la superficie de la pared interna, creando así una alta transferencia de calor por

convección. El calor puede pasar o bien a través de uno o más extremos de la cámara 10 (por ejemplo, en las ventanas 11 y 16), o bien a través de las paredes laterales del recipiente antes de vincularse a la temperatura global del medio de acoplamiento 4. Obsérvese que el calor puede fluir en cualquier dirección, dependiendo de la diferencia relativa entre la temperatura del medio de acoplamiento y el material de muestra, y el objetivo deseado de mantener la muestra a una temperatura objetivo para lograr el efecto deseado. La transferencia entre la pared interna de la cámara 10 y el medio de acoplamiento puede lograrse por conducción simple a través de la pared hasta la superficie exterior, o el área de superficie externa puede potenciarse a través del uso de aletas u otros efectos de transferencia de calor alta tales como un recipiente con camisa con fluido bombeado. Por ejemplo, la figura 18 muestra una disposición ilustrativa en la que una camisa 19 está situada alrededor de al menos parte de la cámara 10 y se hace circular un medio de transferencia térmica 50 en el espacio entre la camisa 19 y la pared externa de la cámara 10. Además, los conductos de entrada y/o salida también pueden acoplarse a la temperatura del medio de acoplamiento y/o el medio de transferencia térmica mediante el uso de superficies térmicas potenciadas en la entrada, o salida de la cámara 10. Por ejemplo, aunque no mostrado en la figura 18, la entrada 13 y/o salida 14 pueden pasar a través del espacio entre la camisa 19 y la cámara 10 para transferir calor con respeto al medio de transferencia térmica 50. Alternativamente, el conducto de medio de entrada y/o salida puede incluir características de intercambiador de calor que permiten que se transfiera calor con respecto al medio de acoplamiento acústico 4.

En determinadas realizaciones, la fuente de energía acústica 2 puede incluir un transductor de ultrasonidos que proyecta un haz de ultrasonidos enfocado o frente de ondas hacia la ventana 11 de la cámara 10. La ventana 11, que puede cerrar de manera sellante una abertura en la cámara 10, puede ser adecuadamente transparente a, o transmitir de otra forma energía acústica de modo que el haz de ultrasonidos penetra en la ventana 11 para formar una zona focal dentro del volumen interno 12 que actúa sobre el material en la cámara 10. La ventana 11 puede estar configurada para transmitir una cantidad máxima de energía ultrasonora al material en la cámara 10, minimizar la absorción de energía ultrasonora dentro de las paredes de la cámara 10, y/o maximizar la transferencia de calor entre el volumen interno 12 y, por ejemplo, un baño de agua externo u otro medio de acoplamiento. En determinadas realizaciones, la ventana 11 es de vidrio, zafiro, cuarzo o un polímero tal como un polímero de película delgada. La ventana puede tener cualquier conformación adecuada u otra configuración, por ejemplo, puede ser plana (o de otra forma presentar una superficie relativamente plana a la energía acústica incidente), o puede estar curvada para tener una conformación semiesférica u otra convexa. En determinadas realizaciones, la ventana 11 está conformada para guiar la energía sónica de una manera preferida en relación con el volumen interno 12, tal como enfocar o desenfocar la energía acústica, a través de un efecto de "lente" provocado por la conformación física de la ventana 11 (tal como un efecto provocado por una conformación cóncava o convexa). En algunas realizaciones, la ventana 11 tiene una impedancia acústica similar a la del agua y una absorción acústica relativamente baja. Un material preferido es polietileno de baja densidad, pero pueden usarse otros polímeros tales como polipropileno, poliestireno, poli(tereftalato de etileno) ("PET"), poliimida, y otros polímeros rígidos y flexibles. Si la ventana 11 está formada de un material de película delgada, la película puede ser un laminado para facilitar la unión térmica a la cámara 10. Por ejemplo, la ventana 11 puede unirse de manera sellante a la cámara 10 usando termosellado. También pueden emplearse materiales más gruesos, más rígidos para la ventana 11.

La porción superior de la cámara 10 puede incluir una ventana de inspección 16, que puede ser plana o con forma de cúpula o dispuesta de otra forma para encerrar el volumen interno 12 mientras que se permite la inspección con luz visible del volumen interno 12. Tal inspección puede realizarla un humano, o mediante un sensor 21 dispuesto adecuadamente tal como una cámara de vídeo, fotodetector, detector de IR, y así sucesivamente. Las características del material en el volumen 12 interno detectadas por el sensor 21 puede usarlas el controlador 20 para controlar la fuente de energía acústica 2 u otros componentes del sistema 1. Por ejemplo, si tiene que evitarse una cavitación excesiva, el controlador 20 puede ajustar la energía acústica en la zona focal si el sensor 21 detecta la presencia de burbujas de cavitación de un determinado tamaño y/o número. Pueden detectarse otras características mediante el sensor 21, tales como el tamaño, la densidad u otras características de partículas en la cámara 10 en el caso en el que el tratamiento acústico esté destinado a descomponer el tamaño de las partículas en el material de muestra. Por tanto, el sensor 21 puede detectar si el tratamiento acústico está progresando tal como se desea y si el procesamiento está completo, por ejemplo, para desencadenar la introducción de material de muestra adicional en la cámara 10. Como la ventana 11, la ventana de inspección 16 puede estar formada de cualquier material adecuado, tal como vidrio, zafiro, cuarzo y/o materiales poliméricos.

El cuerpo de la cámara 10 puede estar hecho de cualquier material o combinación de materiales adecuados para contener el material en el volumen interno 12 durante el tratamiento, para actuar como sello medioambiental, y/o para proporcionar un mecanismo de transferencia térmica. En algunas realizaciones, la cámara 10 puede estar hecha de un material rígido o flexible, tal como un metal o polímero térmicamente conductor, o una combinación de tales materiales. Preferiblemente, el material usado para la cámara 10 tiene una baja absorción acústica y propiedades de transferencia de calor aceptables para una aplicación deseada. En determinadas realizaciones, la porción superior de la cámara 10 (por ejemplo, que incluye la ventana de inspección 16) puede estar dispuesta para reflejar la energía acústica de nuevo al interior del volumen interno 12, proporcionando eficacias de proceso adicionales. Si la cámara 10 está hecha de múltiples partes, tales como por elementos superiores e inferiores, los elementos pueden unirse entre sí mediante unión térmica, unión adhesiva, fijación externa, elementos de sujeción mecánicos (tal como los pernos mostrados en la figura 16) con una junta tórica u otra junta para formar un sello

entre los elementos, soldadura, y así sucesivamente. Si la unión va a lograrse mediante unión térmica, los elementos superior e inferior pueden estar hechos de, o incluir, laminados de película que tienen capas externas que pueden unirse por calor y capas internas resistentes al calor.

5 Tal como puede observarse en la figura 17, el sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir un recipiente 503 que contiene la fuente de energía acústica 2, la cámara 10 así como un medio de acoplamiento 4. El recipiente 503 puede adoptar cualquier tamaño, conformación adecuados u otra configuración, y puede estar hecho de cualquier material adecuado o combinación de materiales (tales como metal, plástico, materiales compuestos, etc.). En esta realización ilustrativa, el recipiente 503 tiene una configuración de tipo bote o tarro con una abertura 31 dispuesta
10 para permitir el acceso a un volumen interno del recipiente 503. La fuente de energía acústica 2 y el medio de acoplamiento 4 (tal como agua u otro líquido, u opcionalmente un material sólido) pueden estar situados en el recipiente 503, por ejemplo, con la fuente de energía acústica 2 cerca del fondo del recipiente 503. (Si el material de acoplamiento 4 es sólido, el recipiente 503 y el medio de acoplamiento 4 pueden estar esencialmente integrados entre sí, funcionando el medio de acoplamiento 4 esencialmente como acoplamiento acústico así como unión física de la fuente acústica 2 y la cámara 10). La abertura 31 puede estar dispuesta de modo que la cámara 10 puede bajarse dentro del recipiente 503, por ejemplo, de modo que la cámara 10 está parcial o completamente sumergida en el medio de acoplamiento 4. El medio de acoplamiento 4 puede funcionar tanto como medio de acoplamiento acústico, por ejemplo, para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica 2 hasta la ventana 11, así como medio de acoplamiento térmico, por ejemplo, para aceptar energía térmica desde la cámara 10. En otras realizaciones, los medios de acoplamiento acústico y térmico pueden estar separados, por ejemplo, cuando la cámara 10 está dotada de una camisa de enfriamiento 19 como la de la figura 18.

En esta realización ilustrativa, la abertura 31 está dimensionada y conformada para recibir la cámara 10, que tiene una conformación de cilindro en esta realización extendiéndose la entrada 13 y salida 14 generalmente a lo largo del
25 eje longitudinal de la conformación de cilindro de la cámara 10. Una tapa 517 está ajustada con los conductos de entrada 13 y salida 14 y está dispuesta de modo que la cámara 10 puede estar suspendida en el medio de acoplamiento 4, soportada por los conductos de entrada y salida y la tapa 517. La cámara 10 puede estar situada en el recipiente 503 de modo que una zona focal de energía acústica creada por la fuente de energía acústica 2 está ubicada adecuadamente en el volumen interno 12 de la cámara 10. Por tanto, el ensamblaje del sistema 1 puede facilitarse porque puede lograrse el posicionamiento apropiado de la cámara 10 en relación con la fuente de energía acústica 2 ajustando simplemente la tapa 517 con la abertura 31 del recipiente 503. No se requiere ajuste de la posición de la cámara 10 en el recipiente 503 siempre que la cámara esté situada adecuadamente en relación con la tapa 517 y la tapa 517 esté apropiadamente ajustada con el recipiente 503. La tapa 517 puede ajustarse con la abertura 31 del recipiente 503 de modo que no sólo la tapa 517/cámara 10 estén soportadas por el recipiente 503,
35 sino también que la abertura 31 del recipiente esté sellada o cerrada de otra forma por la tapa 517, por ejemplo, para ayudar a impedir la contaminación del medio de acoplamiento 4. Los conductos de entrada y salida pueden pasar a través de la tapa 517, por ejemplo, para la conexión de fluido a líneas de suministro y/o retorno u otros conductos que portan el material que va a tratarse a la cámara 10.

40 Debe entenderse que la cámara 10 puede estar dispuesta de cualquier modo adecuado, y para una variedad de aplicaciones diferentes. Por ejemplo, en la realización mostrada en la figura 17, la entrada 13 y salida 14 se comunican con el volumen interno 12 en lados opuestos del volumen 12 y a un mismo nivel vertical. Sin embargo, la entrada 13 y salida 14 pueden comunicarse con el volumen interno 12 de otros modos, por ejemplo, la entrada 13 puede acoplarse de manera fluida con el volumen interno 12 en una ubicación que está por encima, o por debajo, de una ubicación donde la salida está acoplada de manera fluida al volumen interno. Tener la entrada y salida acopladas a diferentes alturas puede proporcionar ventajas dependiendo de la aplicación específica. Por ejemplo, en algunas aplicaciones, tener la entrada ubicada por encima de la salida puede ayudar a controlar la temperatura del material en el volumen interno 12, por ejemplo, el fluido de enfriador que entra en la entrada puede mezclarse con el fluido relativamente caliente cerca de una parte superior del volumen interno 12. En otras aplicaciones, tener la entrada por debajo de la salida puede ayudar a garantizar que el material que tiene un tamaño o densidad deseado se estimule a salir por la salida, por ejemplo, partículas más grandes, más densas pueden permanecer en el volumen interno 12 por debajo de la salida hasta que las partículas se descomponen mediante el tratamiento acústico para dar un intervalo de tamaño/densidad deseado. En el caso de una cámara con camisa de agua, el posicionamiento de la entrada y salida en extremos opuestos de la cámara puede permitir una operación de intercambiador de calor a contracorriente y un control de temperatura y transferencia de calor mejorados de la muestra.

Según otro aspecto de la invención, la cámara 10 puede incluir uno o más elementos de inserción que pueden proporcionarse en el volumen interno 12 para definir, al menos en parte, la conformación y el tamaño del volumen interno. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 19, un elemento de inserción 518 que tiene una disposición de manguito con una conformación cilíndrica externa y una conformación frustocónica o cónica interna puede proporcionarse en el volumen interno 12 para definir el tamaño y la conformación del volumen interno 12 donde tendrá lugar el tratamiento acústico. En esta realización, el espacio interno definido por el elemento de inserción 518 funciona como volumen interno 12 donde se trata acústicamente el material. El elemento de inserción 518 puede estar hecho de una variedad de conformaciones, tamaños y materiales diferentes, dependiendo de la aplicación u otra función deseada. Por ejemplo, el elemento de inserción 518 puede incluir una pluralidad de sitios de nucleación,

por ejemplo, proporcionados por la superficie de un material cerámico del elemento de inserción 518, que sirven como sitios de iniciación para la cavitación. Son posibles otras disposiciones, incluyendo perlas, varillas cerámicas o elementos hechos de otros materiales, que se sitúan en el volumen interno 12 y funcionan proporcionando sitios de nucleación, para ayudar a transferir o distribuir de otra forma el calor en la cámara 10, proporcionando sitios de reacción o catalizando o ayudando de otra forma a las reacciones químicas u otras en el volumen 12, y otras funciones. Las varillas, perlas u otras estructuras pueden estar suspendidas en el volumen interno 12, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 20 mediante un soporte físico y/o mediante mezclado u otro movimiento de fluido en el volumen interno provocado por la energía acústica u otro flujo de material.

Según un aspecto de la invención, el sistema 1, por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 16 y 17 así como otras realizaciones descritas a continuación, puede estar dispuesto para alojar el tratamiento acústico continuo de material en una cámara 10, o múltiples cámaras 10, durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, durante 1 hora o más, a una intensidad relativamente alta, por ejemplo, a una emisión del transductor acústico de 200 vatios o más, sin experimentar una acumulación de calor excesiva u otros problemas. En una realización, un transductor piezoeléctrico que funciona en parte de la fuente de energía acústica 2 puede funcionar a un nivel de intensidad igual a aproximadamente 286 vatios durante varias horas en un estado de equilibrio, es decir, un estado en el que el material se procesa acústicamente en una cámara 10 sin acumulación de calor excesiva, quemado o fallo del transductor, u otros estados que requieren la detención del tratamiento acústico. Esto está en contraposición a las disposiciones de tratamiento acústico anteriores en las que podría no haberse logrado un tratamiento acústico continuo durante 1 hora o más por una variedad de diferentes motivos, tales como acumulación de calor excesiva, fallo de la fuente acústica (por ejemplo, debido a sobrecalentamiento del transductor y posterior quemado), daño al material de muestra, y así sucesivamente.

Transductor

En determinadas realizaciones, la fuente de energía sónica 2 puede incluir, por ejemplo, un transductor de ultrasonidos u otro transductor, que produce ondas acústicas en el intervalo de frecuencia "ultrasónico". Las ondas ultrasónicas comienzan a frecuencias por encima de las que son audibles, normalmente, de aproximadamente 20.000 Hz o 20 kHz, y continúan en la región de ondas de megahercios (MHz). La velocidad del sonido en el agua es de aproximadamente 1000 metros por segundo, y por tanto la longitud de onda de una onda de 1000 Hz en el agua es de aproximadamente un metro, normalmente demasiado larga para su enfoque específico en áreas individuales menores de un centímetro de diámetro, aunque pueden usarse en situaciones de campo no enfocado. A 20 kHz la longitud de onda es de aproximadamente 5 cm, que es eficaz en recipientes de tratamiento relativamente pequeños. Dependiendo del volumen del recipiente y la muestra, las frecuencias preferidas pueden ser superiores, por ejemplo, a aproximadamente 100 kHz, aproximadamente 1 MHz o aproximadamente 10 MHz, con longitudes de onda, respectivamente, de aproximadamente 1,0, 0,1 y 0,01 cm. En cambio, para sonicación convencional, incluyendo soldadura sónica, las frecuencias son normalmente, de aproximadamente en las decenas de kHz, y para obtención de imágenes, las frecuencias son más normalmente, de aproximadamente 1 MHz y hasta aproximadamente 20 MHz. En litotripsia, las velocidades de repetición de pulsos son bastante bajas, midiéndose en el intervalo de hercios, pero la nitidez de los pulsos generados proporciona una longitud de onda de pulsos eficaz, o en este caso, un tiempo de subida de pulso, con un contenido de frecuencia de hasta aproximadamente 100 a aproximadamente 300 MHz, o de 0,1-0,3 gigahercios (GHz).

La frecuencia usada en determinadas realizaciones de la invención también estará influida por las características de absorción de energía de la muestra o de la cámara 10, para una frecuencia particular. En la medida en que una frecuencia particular se absorba mejor o se absorba preferentemente por el material de muestra, puede preferirse. La energía puede suministrarse en forma de pulsos cortos o como un campo continuo durante una duración de tiempo definida. Los pulsos pueden estar agrupados o separados regularmente.

Puede generarse un haz de ultrasonidos enfocado generalmente orientado verticalmente de diversos modos mediante la fuente de energía acústica 2. Por ejemplo, un transductor piezoeléctrico de un único elemento, tal como los suministrados por Sonic Concepts, Woodinville, Wash., que puede ser un transductor de un único elemento enfocado de 1,1 MHz, puede tener una superficie de transmisión esférica u otra curvada que está orientada de manera que el eje focal es vertical. Otra realización usa un transductor no enfocado plano y una lente acústica (por ejemplo, la ventana 11 u otro elemento) para enfocar el haz. Todavía otra realización usa un transductor de múltiples elementos tal como una matriz anular conjuntamente con electrónica de enfoque para crear el haz enfocado. La matriz anular puede reducir potencialmente los lóbulos laterales acústicos cerca del punto focal por medio de apodización electrónica, es decir reduciendo intensidad de la energía acústica, o bien electrónicamente o bien mecánicamente, en la periferia del transductor. Este resultado puede lograrse mecánicamente bloqueando de manera parcial el sonido alrededor de los bordes de un transductor o reduciendo la potencia en los elementos exteriores de un transductor de múltiples elementos. Esto reduce los lóbulos laterales cerca del foco de energía, y puede ser útil para reducir el calentamiento de la cámara 10. Alternativamente, puede sincronizarse una matriz de transductores pequeños para crear un haz convergente. Todavía otra realización combina un transductor no enfocado con un espejo acústico de enfoque para crear el haz enfocado. Esta realización puede ser ventajosa a frecuencias inferiores cuando las longitudes de onda son grandes en relación con el tamaño del transductor. El eje del transductor de esta realización puede ser horizontal y un espejo acústico conformado usado para reflejar la

energía acústica verticalmente y enfocar la energía dentro de un haz convergente.

En determinadas realizaciones, la zona focal puede ser pequeña en relación con las dimensiones de la cámara de tratamiento 10 para evitar el calentamiento de la cámara de tratamiento 10. En una realización, la zona focal tiene una anchura de aproximadamente 1 mm. El calentamiento de la cámara de tratamiento 10 puede reducirse minimizando los lóbulos laterales acústicos cerca de la zona focal. Los lóbulos laterales son regiones de alta intensidad acústica alrededor del punto focal formadas por interferencia constructiva de frentes de ondas consecutivos. Los lóbulos laterales pueden reducirse apodizando el transductor o bien electrónicamente, haciendo funcionar los elementos externos de un transductor de múltiples elementos a una potencia inferior, o bien mecánicamente, bloqueando de manera parcial las ondas acústicas alrededor de la periferia de un transductor de un único elemento. Los lóbulos laterales también pueden reducirse usando estallidos cortos, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 ciclos en el protocolo de tratamiento.

El transductor puede estar formado por un material piezoeléctrico, tal como una cerámica piezoeléctrica. La cerámica puede fabricarse como una "cúpula", que tiende a enfocar la energía. Una aplicación de tales materiales es en reproducción de sonido; sin embargo, tal como se usa en el presente documento, la frecuencia es generalmente mucho más alta y el material piezoeléctrico normalmente se sobrecargaría, es decir se accionaría por una tensión más allá de la región lineal de la respuesta mecánica al cambio de tensión, para intensificar los pulsos. Normalmente, estas cúpulas tienen una longitud focal mayor que la encontrada en sistemas litotripticos, por ejemplo, aproximadamente 20 cm frente a aproximadamente 10 cm de longitud focal. Las cúpulas de cerámica pueden amortiguarse para impedir la oscilación. La respuesta es lineal si no se sobrecarga. La zona de foco de energía alta de una de estas cúpulas tiene normalmente una conformación de cigarrillo. A 1 MHz, la zona focal tiene aproximadamente 6 cm de longitud y aproximadamente 2 cm de anchura para una cúpula de 20 cm, o aproximadamente 15 mm de longitud y aproximadamente 3 mm de anchura para una cúpula de 10 cm. La presión positiva máxima obtenida a partir de tales sistemas es una presión de aproximadamente 1 MPa (mega Pascal) a aproximadamente 10 MPa, o de aproximadamente 150 PSI (libras por pulgada cuadrada) a aproximadamente 1500 PSI, dependiendo de la tensión de accionamiento. La zona focal, que se define que tiene una intensidad acústica dentro de aproximadamente 6 dB de la intensidad acústica máxima, se forma alrededor del punto focal geométrico.

La longitud de onda, o tiempo de subida característico multiplicado por la velocidad del sonido para una onda de choque, está en el mismo intervalo de tamaño general que una célula biológica, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 micrómetros. Esta longitud de onda eficaz puede variarse mediante la selección de la amplitud y tiempo de pulso, mediante el grado de enfoque mantenido a través de las superficies de contacto entre la fuente y el material que va a tratarse, y similares.

Otra fuente de ondas de presión acústicas enfocadas es un transductor electromagnético y un concentrador parabólico, tal como se usa en litotripsia. La excitación de tales dispositivos tiende a ser más energética, con regiones focales similares o más grandes. Se han observado presiones negativas máximas focales fuertes de aproximadamente -16 MPa. Presiones negativas máximas de esta magnitud proporcionan una fuente de burbujas de cavitación en el agua, lo que puede ser deseable en un proceso de extracción.

Electrónica de accionamiento y control de la forma de onda

Un protocolo de tratamiento para tratar material con energía acústica en la cámara 10 puede incluir formas de ondas acústicas variables combinadas con el movimiento y posicionamiento de la muestra para lograr un efecto deseado. La forma de onda acústica del transductor puede tener muchos efectos, incluyendo: micropropagación acústica en y cerca de las células debido a cavitación, es decir flujo inducido por, por ejemplo, el colapso de burbujas de cavitación; ondas de choque debidas a características no lineales del baño de fluido; ondas de choque debidas a burbujas de cavitación; efectos térmicos, que conducen al calentamiento de la muestra, calentamiento del recipiente de la muestra, y/o transferencia de calor por convección debido a propagación acústica; efectos de flujo, que provocan la desviación del material de muestra de la zona focal debido a cizalladura y presión acústica, así como mezclado debido a propagación acústica, es decir flujo inducido por presión acústica; y efectos químicos. La forma de onda de ondas sonoras enfocadas puede ser un único pulso de ondas de choque, una serie de pulsos de ondas de choque individuales, una serie de estallidos de ondas de choque de varios ciclos cada uno, o una forma de onda continua. Las formas de onda incidentes pueden enfocarse directamente mediante o bien un único elemento, tal como un transductor ultrasónico piezoeléctrico de cerámica enfocado, o bien mediante una matriz de elementos con sus trayectorias convergiendo en un foco. Alternativamente, pueden producirse múltiples focos para proporcionar tratamiento ultrasónico a múltiples zonas, recipientes o pocillos de tratamiento. Adicionalmente, el flujo del material de muestra al interior o fuera de la cámara de procesamiento 10 puede interactuar con los efectos acústicos, y la propagación acústica puede modificarse para potenciar este flujo de muestra de una manera deseable.

El protocolo de tratamiento puede optimizarse para maximizar la transferencia de energía al tiempo que se minimizan los efectos térmicos y de flujo. El protocolo de tratamiento también puede mezclar eficazmente el contenido de la cámara de tratamiento 10, en el caso de una muestra particulada suspendida en un líquido. La transferencia de energía al interior de la muestra puede controlarse ajustando los parámetros de la onda acústica tales como frecuencia, amplitud y ciclos por estallido. El aumento de temperatura en la muestra puede controlarse

limitando el ciclo de trabajo del tratamiento y optimizando la transferencia de calor entre la cámara de tratamiento 10 y el medio de acoplamiento 4. La transferencia de calor puede potenciarse fabricando la cámara de tratamiento 10 con paredes delgadas, de un material de conducción térmica relativamente alta, y/o promoviendo la convección forzada mediante propagación acústica en la cámara de tratamiento 10 y en el baño de fluido en las proximidades de la cámara de tratamiento 10. Adicionalmente, la cámara 10 puede modificarse para potenciar el acoplamiento térmico entre la muestra y el entorno exterior proporcionando tratamientos de superficie potenciados tales como área aumentada tal como aletas, una camisa de agua bombeada de manera activa y/o materiales de recipiente de conductividad alta. La monitorización y el control de la temperatura se comentan en más detalle a continuación.

Por ejemplo, para un tratamiento de alteración y extracción celular, un ejemplo de una forma de onda de energía eficaz es una onda sinusoidal de alta amplitud de aproximadamente 1000 ciclos seguida por un tiempo muerto de aproximadamente 9000 ciclos, que es un ciclo de trabajo de aproximadamente el 10%, a una frecuencia de aproximadamente 1,1 MHz. El aporte eléctrico de la onda sinusoidal al transductor da como resultado normalmente una emisión acústica de onda sinusoidal a partir del transductor. Puesto que las ondas sinusoidales enfocadas convergen en el punto focal, pueden convertirse en una serie de ondas de choque debido a las propiedades acústicas no lineales del agua u otro fluido en el medio de acoplamiento 4. Este protocolo trata el material en la zona focal eficazmente durante el tiempo de “encendido”. A medida que se trata el material, se expulsa de la zona focal y circula nuevo material al interior de la zona focal. Los tiempos de “encendido” y “apagado” acústicos pueden disponerse en ciclos para que sean eficaces, por ejemplo, para extraer el contenido celular de tejido de hojas particulado o triturado, al tiempo que se provoca una elevación de temperatura mínima en el recipiente de tratamiento.

Puede obtenerse una ventaja adicional en la alteración y otros procesos creando un intervalo de “tratamiento” de alta potencia que se alterna con un intervalo de “mezclado” de baja potencia. Más particularmente, en este ejemplo, el intervalo de “tratamiento” utiliza una onda sinusoidal que tiene una frecuencia de tratamiento, un recuento de ciclos por estallido del tratamiento y una amplitud de pico a pico de tratamiento. El intervalo de “mezclado” tiene una frecuencia de mezclado, un recuento de ciclos por estallido de mezclado y una amplitud de pico a pico de mezclado inferior. Tras cada uno de los intervalos hay un tiempo muerto. Por supuesto, estas relaciones son meramente un ejemplo de muchos, donde un intervalo se considera que es una potencia alta y un intervalo se considera que es una potencia baja, y estas variables y otras pueden alterarse para producir situaciones más o menos energéticas. Adicionalmente, la función o el intervalo de tratamiento y la función o el intervalo de mezclado podrían emitirse desde diferentes o múltiples transductores en el mismo aparato, emitiendo opcionalmente a diferentes frecuencias.

Los tratamientos de intervalo de potencia alta/potencia baja pueden permitir que se realicen múltiples operaciones, tales como alterar la permeabilidad de los componentes, tales como células, dentro de la muestra seguido por mezclado posterior de la muestra. El intervalo de tratamiento puede maximizar la cavitación y efectos biológicos, al tiempo que el intervalo de mezclado puede maximizar el mezclado dentro del recipiente de tratamiento y/o generar un calor mínimo. La adición de un intervalo de “supermezclado” de alta potencia, más largo ocasionalmente para agitar las partículas que se atrapan alrededor de la periferia de la cámara 10 puede proporcionar beneficios adicionales. Este intervalo de “supermezclado” genera calor adicional, de modo que está programado para tratar de manera poco frecuente durante el proceso, por ejemplo, cada pocos segundos. Adicionalmente, los tiempos muertos entre los intervalos de mezclado y tratamiento, tiempo durante el cual no se emite sustancialmente energía desde la fuente de energía sónica, pueden permitir que circule material nuevo al interior de la zona focal de energía de la diana.

La forma de onda de la onda de sonido se selecciona normalmente para el material particular que está tratándose. Por ejemplo, para potenciar la cavitación, puede ser deseable aumentar la presión negativa máxima tras la presión positiva máxima. Para otras aplicaciones, puede ser deseable reducir la cavitación, pero mantener la presión positiva máxima. Este resultado puede lograrse realizando el proceso en una cámara presurizada 10 a una presión ligeramente por encima de la ambiental. Por ejemplo, si la forma de onda generada tiene una presión negativa máxima de aproximadamente -5 MPa, entonces toda la cámara puede presurizarse hasta aproximadamente 10 MPa para eliminar que se produzca cavitación durante el proceso. El material que va a tratarse puede presurizarse en una base discontinua o continua dentro del volumen interno 12 de la cámara 10. Es decir, puede suministrarse un volumen de material al interior del volumen interno 12, tratarse acústicamente mientras que el flujo de material se detiene, y luego puede suministrarse un nuevo volumen de material al interior del volumen interno 12 una vez que se completa el tratamiento del volumen inicial.

Normalmente, la onda de choque se caracteriza por un frente de choque rápido con una presión máxima positiva en el intervalo de aproximadamente 15 MPa, y una presión máxima negativa en el intervalo de aproximadamente menos 5 MPa. Esta forma de onda es de aproximadamente unos pocos microsegundos de duración, tal como aproximadamente 5 microsegundos. Si el pico negativo es mayor de aproximadamente 1 MPa, pueden formarse burbujas de cavitación. La formación de burbujas de cavitación también depende del medio circundante. Por ejemplo, el glicerol es un medio inhibidor de la cavitación, mientras que el agua líquida es un medio que promueve la cavitación. El colapso de las burbujas de cavitación forma “microchorros” y turbulencia que inciden sobre el material circundante.

El control de la fuente de energía acústica 2 puede realizarse mediante el controlador 20 usando un mecanismo de control por retroalimentación de modo que cualquiera de exactitud, reproducibilidad, velocidad de procesamiento, control de temperatura, provisión de uniformidad de exposición a pulsos sónicos, detección del grado de finalización del procesamiento, monitorización de la cavitación y control de las propiedades del haz (incluyendo intensidad, frecuencia, grado de enfoque, patrón de tren de ondas y posición), pueden potenciar el rendimiento del sistema de tratamiento 1. Puede usarse una variedad de sensores o propiedades detectadas mediante el controlador 20 para proporcionar un aporte para el control por retroalimentación. Estas propiedades pueden incluir detección de la temperatura del material de muestra; intensidad del haz sónico; presión; propiedades del medio de acoplamiento incluyendo temperatura, salinidad y polaridad; posición del material de muestra; conductividad, impedancia, inductancia, y/o los equivalentes magnéticos de estas propiedades, y propiedades ópticas o visuales del material de muestra. Estas propiedades ópticas, que pueden detectarse mediante el sensor 21 normalmente en los intervalos visible, IR y UV, pueden incluir color aparente, emisión, absorción, fluorescencia, fosforescencia, dispersión, tamaño de partícula, velocidades de partículas y fluido por láser/Doppler y viscosidad eficaz. La integridad o trituración de la muestra puede detectarse con un análisis del patrón de una señal óptica a partir del sensor 21. El tamaño de partícula, el nivel de solubilidad, la uniformidad física y la forma de las partículas podrían medirse todas usando instrumentación o bien tomando muestras completamente independientes del fluido y proporcionando una señal de retroalimentación, o bien integrada directamente con el sistema acústico enfocado por medio de puntos de superficie de contacto de medición tal como una ventana óptica. Cualquier propiedad detectada o combinación de las mismas puede servir como aporte a un sistema de control. La retroalimentación puede usarse para controlar cualquier emisión del sistema, por ejemplo propiedades de haz, posición de la muestra o flujo en la cámara 10, duración del tratamiento y pérdidas de energía en los límites y en tránsito por medio de reflexión, dispersión, difracción, absorción, desfase y desintonización.

Según determinadas realizaciones de la presente invención, varios aspectos del sistema de tratamiento 1 pueden potenciar la reproducibilidad y/o eficacia de tratamientos particulares que usan energía ultrasónica en aplicaciones *in vitro*, en donde se desean reproducibilidad, uniformidad y control preciso. Estos aspectos incluyen el uso de retroalimentación, enfoque preciso de la energía ultrasónica, monitorización y regulación de la forma de onda acústica (incluyendo frecuencia, amplitud, ciclo de trabajo y ciclos por estallido), posicionamiento de la cámara 10 en relación con la energía ultrasónica de modo que el material de muestra se trate uniformemente, control del movimiento o flujo de la muestra en relación con el foco de energía ultrasónica durante una etapa de procesamiento, y/o control de la temperatura de la muestra que está tratándose, o bien mediante los parámetros de energía ultrasónica o a través del uso de dispositivos de control de la temperatura tales como un baño de agua. Un protocolo de tratamiento puede optimizarse usando una o una combinación de las variables anteriores, para maximizar, por ejemplo, la cizalladura, extracción, permeabilización, trituración, agitación u otras etapas de proceso, al tiempo que se minimizan los efectos térmicos no deseables.

En una realización de la invención, se enfoca energía ultrasónica de alta intensidad sobre una cámara 10, y se usa retroalimentación "en tiempo real" con respecto a una o más variables de proceso para controlar el proceso. En otra realización, el proceso está automatizado y se usa en un sistema de alto rendimiento, tal como una corriente de flujo continuo de material que va a tratarse, opcionalmente segmentada.

En determinadas realizaciones, el sistema de procesamiento puede incluir un transductor de alta intensidad que produce energía acústica cuando se acciona mediante un aporte de energía óptica o eléctrica; un dispositivo o sistema para controlar la excitación del transductor, tal como un generador de formas de onda arbitrarias, un amplificador de RF y una red de adaptación para controlar parámetros tales como tiempo, intensidad y ciclo de trabajo de la energía ultrasónica; un sistema o método para transferir material al interior y fuera de la zona de proceso, o bien de manera activa o bien de manera pasiva, para permitir la automatización y la implementación de retroalimentación a partir de la monitorización; un sensor de temperatura; un dispositivo para controlar la temperatura; una o más cámaras de reacción 10; y un sensor para detectar, por ejemplo, firmas ópticas, de radiación y/o acústicas. La señal de retroalimentación también puede proceder de una señal proporcionada por métodos de medición o bien externos o bien integrados tales como tamaño de partícula, solubilidad y factores de forma.

Aspectos adicionales de la invención se refieren a disposiciones de circuito de flujo de material para tratar acústicamente el material. Por ejemplo, en algunas realizaciones el material de muestra puede transferirse a/desde la cámara de tratamiento a través de medios pasivos o activos, con el uso de métodos de bombeo directo o métodos accionados por gravedad pasiva.

En una realización ilustrativa mostrada esquemáticamente en la figura 22, un sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir una o más cámaras de tratamiento 10 que están acopladas de manera fluida a un depósito 30 que contiene material que va a tratarse en la cámara 10. En esta realización ilustrativa, la entrada 13 de la cámara 10 está acoplada de manera fluida a un conducto de suministro 31 y la salida 14 de la cámara 10 está acoplada de manera fluida a un conducto de retorno 32. Por tanto, el material en el depósito 30 puede hacerse circular a través de la cámara 10 a cualquier velocidad de flujo, presión, tiempo u otro parámetro adecuado de modo que el material se procese adecuadamente mediante energía acústica en la cámara 10. Puede provocarse el flujo del material mediante gravedad, mediante propagación acústica (por ejemplo, en la cámara 10), mediante una bomba 33 (tal

como una bomba de jeringa, una bomba peristáltica, una bomba de engranajes, y así sucesivamente), u otra fuerza motriz. En algunas realizaciones, puede mantenerse una presión en la cámara 10 (y/o en el depósito 30) aplicando un gas presurizado, una bomba u otro componente para generar la presión deseada en las ubicaciones deseadas. Tal como se comentó anteriormente, la presurización del material en la cámara 10 y/o en otra parte puede ayudar a reducir la cavitación, potenciar las velocidades de reacción y/o tener otros efectos deseados.

En un aspecto de la invención, el depósito 30 puede incluir un agitador 34, tal como una pala de mezclado, agitador, homogeneizador u otro dispositivo que funciona mezclando mecánicamente, cizallando o provocando de otra forma el movimiento del material en el depósito 30. El movimiento del material puede tener efectos deseados, tales como tratar previamente el material antes del tratamiento acústico, mantener una distribución deseada de componentes del material por todo el volumen en el depósito, y así sucesivamente. Una disposición como la de la figura 21 puede permitir que el sistema 1 exponga repetidamente el material a tratamiento acústico de modo que el material tenga propiedades deseadas cuando se completa el tratamiento. Las condiciones de tratamiento acústico en la cámara 10 pueden permanecer constantes, o casi constantes a lo largo de todo el proceso, o las condiciones pueden cambiar a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el material puede incluir inicialmente partículas relativamente grandes de una sustancia que van a descomponerse en partículas más pequeñas y en última instancia solubilizarse en un líquido portador. Las condiciones de tratamiento acústico iniciales (así como el funcionamiento del agitador 34) pueden ser favorables para descomponer las partículas grandes en partículas más pequeñas. Tras algún tratamiento inicial, las partículas grandes pueden descomponerse, y las condiciones de tratamiento acústico (y el funcionamiento del agitador 34) pueden ajustarse para potenciar la velocidad y eficacia de poner en disolución los componentes de las partículas pequeñas. Pueden hacerse ajustes en las condiciones de tratamiento basándose en cualquier criterio adecuado, tal como propiedades del material detectadas (tales como tamaño de partícula, densidad, etc.), un tiempo transcurrido, aporte del usuario, y así sucesivamente. El sistema 1 puede incluir opcionalmente un segundo depósito 35 que recibe material cuando se determina que el procesamiento del material está completo (de nuevo, determinación que puede hacerse basándose en las propiedades detectadas del material, tiempo transcurrido, etc.). En esta realización, el conducto de retorno 32 incluye una válvula de tres vías 36 (u otra disposición adecuada) que permite que el controlador 20 dirija el material al segundo depósito 35 según se desee. Por supuesto, pueden usarse otras disposiciones de control de flujo, y el control del flujo de material al segundo depósito 35 puede basarse en los parámetros detectados, tales como tiempo de procesamiento transcurrido, tamaños de partícula o densidad detectados, color del material u otras propiedades ópticas, u otras características del material de muestra.

La figura 22 muestra otra realización ilustrativa para un sistema de tratamiento acústico 1 que incluye un primer depósito 30 acoplado de manera fluida a una cámara 10 por medio de un conducto de suministro 31, y un segundo depósito 35 acoplado de manera fluida a la cámara 10 por medio de un conducto de retorno 32. En esta realización, el material en el primer depósito 30 puede fluir a través de la cámara 10 para el tratamiento acústico, y después de eso depositarse en el segundo depósito 35. En el caso de que se desee un tratamiento acústico posterior, puede provocarse que el material fluya de nuevo a través de la cámara 10, aunque en la dirección opuesta y al interior del primer depósito 30 tras un segundo tratamiento. El flujo del material puede provocarse de cualquier modo adecuado, tal como mediante una bomba 33, mediante propagación acústica en la cámara 10, mediante gravedad (por ejemplo, estableciendo que el nivel de material en un depósito sea más alto que en el otro, provocando que se cree un sifón para el flujo), u otros. La cámara 10 y/o los conductos 31, 32 pueden incluir una o más ventanas, sensores u otros componentes adecuados para detectar propiedades del material de muestra. Estas características detectadas pueden usarse para controlar diversos parámetros del sistema 1, tales como velocidad de flujo, presión, características del tratamiento acústico, y así sucesivamente.

En otra realización ilustrativa, un sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir dos o más cámaras de tratamiento 10 que están dispuestas de un modo en serie. Por ejemplo, la figura 23 muestra una realización en la que dos cámaras 10 están en comunicación de fluido entre sí y un depósito 30. La primera cámara 10a puede usarse para aplicar un "tratamiento previo" u otro primer tratamiento al material de muestra, mientras que la segunda cámara 10b aplica un "acabado" u otro segundo tratamiento al material. La energía acústica y otros parámetros del tratamiento pueden establecerse y controlarse independientemente en cada cámara 10 para optimizar los objetivos de procesamiento globales. Por ejemplo, el material de muestra puede pasar en primer lugar a través de una fase de "desbaste" en la primera cámara 10a para romper trozos/grumos grandes en el material de muestra (por ejemplo, cuando las condiciones del tratamiento proporcionan un mezclado y homogeneización de nivel alto, general de la muestra) antes de que el material pase a la siguiente fase (por ejemplo, una fase de "acabado") para el tratamiento acústico adicional que refina las propiedades finales del material, tal como extrayendo los materiales deseados, solubilizando los componentes en el material, y así sucesivamente. Pueden usarse tantas fases, es decir, cámaras 10, como sean necesarias en un sistema 1 como el de la figura 23 para lograr el resultado deseado.

Los aspectos de la invención también se refieren a métodos para tratar acústicamente material usando los diversos sistemas 1 descritos anteriormente. Por ejemplo, un método según la invención implica tratar un material usando un sistema como el de la figura 21 en el que el material se agita mediante un agitador en un depósito, se provoca que el material fluya desde el depósito al interior de una cámara 10, se expone el material a energía acústica enfocada en el volumen interno de la cámara 10 (donde la energía acústica en una zona focal tiene las propiedades descritas en el presente documento), y se provoca que el material fluya de nuevo al depósito. Opcionalmente, puede detectarse un estado de procesamiento del material, por ejemplo, mientras que el material está en la cámara 10 o conducto de

retorno, y si el material está adecuadamente procesado, puede provocarse que el material fluya a otro depósito. Pueden contenerse volúmenes relativamente grandes de material, tales como 1 galón, 10 galones, 100 galones, 1000 galones o más de material en el depósito y provocarse que fluya de una manera circulatoria a través de una más cámaras 10 de un modo continuo. Por tanto, el método de tratamiento puede realizarse de manera continua durante 1 hora o más, funcionando la fuente de energía acústica de manera continua a una emisión de potencia equivalente a 200 vatios o más.

Otro método según la invención se refiere a tratar material usando un sistema como el de la figura 22 o un sistema similar. Por ejemplo, puede provocarse que el material fluya en una primera dirección al interior de una cámara 10, el material se expone a energía acústica enfocada en el volumen interno de la cámara 10 (donde la energía acústica en una zona focal tiene las propiedades descritas en el presente documento), y se provoca que el material fluya fuera de la cámara 10. Después de eso, puede provocarse que el material fluya en una segunda dirección opuesta a la primera dirección al interior de la cámara 10, donde el material se trata de nuevo acústicamente, y fluye en la segunda dirección fuera de la cámara 10. Puede provocarse el flujo mediante una o más bombas, propagación acústica, gravedad y/u otras fuerzas motrices. Además, el tratamiento acústico puede realizarse de una manera continua, durante periodos de tiempo prolongados (más de 1 hora) con el funcionamiento de la fuente de energía acústica 2 a una emisión de potencia de 200 vatios o mayor. Como con otros métodos según la invención, pueden combinarse entre sí diversos aspectos, tales como cámaras que incluyen ventanas acústicas, cámaras que incluyen características de intercambiador de calor, y así sucesivamente.

Otro método según la invención se refiere a tratar material usando un sistema como el de la figura 23 o un sistema similar. Por ejemplo, puede provocarse que el material fluya al interior de una primera cámara 10, el material se expone a energía acústica enfocada en el volumen interno de la primera cámara 10 (donde la energía acústica en una zona focal tiene las propiedades descritas en el presente documento), y se provoca que el material fluya fuera de la primera cámara 10, y al interior de una segunda cámara 10, donde el material se trata de nuevo acústicamente. El tratamiento en serie del material puede repetirse con tres o más cámaras, y las condiciones de tratamiento pueden ser iguales, o diferentes, en las diferentes cámaras 10. El tratamiento acústico puede realizarse de una manera continua, durante periodos de tiempo prolongados (más de 1 hora) con el funcionamiento de la fuente de energía acústica 2 a una emisión de potencia de 200 vatios o mayor. Como con otros métodos según la invención, pueden combinarse entre sí diversos aspectos, tales como cámaras que incluyen ventanas acústicas, cámaras que incluyen características de intercambiador de calor, y así sucesivamente.

Gestión y control de temperatura, cavitación, tamaño de partícula, solubilidad y presión.

Monitorización visual de la muestra

Puede emplearse análisis y detección óptica o mediante vídeo para optimizar el tratamiento de la muestra. Por ejemplo, en una suspensión de tejido biológico, la viscosidad de la mezcla puede aumentarse durante el tratamiento debido a la disminución de las partículas mediante el tratamiento y/o mediante la liberación de macromoléculas al interior de la disolución. El análisis mediante vídeo de la muestra durante el tratamiento permite una evaluación automatizada del mezclado provocado por el protocolo de tratamiento. El protocolo puede modificarse durante el tratamiento para promover un mayor mezclado como resultado de esta evaluación. Los datos de vídeo pueden adquirirse y analizarse mediante el sistema de control informático (es decir, parte del controlador 20) que está controlando el proceso de tratamiento. Otras mediciones ópticas tales como excitación espectral, absorción, fluorescencia, emisión y análisis espectral pueden usarse también para monitorizar el tratamiento de la muestra, ya sea en la cámara 10 o en una trayectoria de flujo aguas arriba o aguas abajo de la cámara 10. Puede usarse un haz de láser, por ejemplo, para la alineación y para indicar la posición de la muestra actual. En determinadas realizaciones la detección visual u óptica puede realizarse a través de una ventana en la cámara de reacción. Esta ventana puede ser la ventana superior o inferior de la cámara 10, una ventana visual integrada en el propio lateral del recipiente, o puede ser una ventana integrada en los tubos de transferencia o depósito de muestra.

Control de temperatura

Determinadas aplicaciones requieren que la temperatura de la muestra que está procesándose se gestione y controle durante el procesamiento. Por ejemplo, muchas muestras biológicas no deben calentarse por encima de 4°C durante el tratamiento. Otras aplicaciones requieren que las muestras se mantengan a una determinada temperatura elevada durante el tratamiento. El protocolo de tratamiento por ultrasonidos influye en la temperatura de la muestra de varios modos: la muestra absorbe energía acústica y la convierte en calor; la cámara de tratamiento de la muestra absorbe energía acústica y la convierte en calor que, a su vez, puede calentar la muestra; y se desarrolla propagación acústica dentro de la cámara de tratamiento de la muestra y el medio de acoplamiento, formando una transferencia de calor por convección entre la cámara de tratamiento de la muestra y el medio de acoplamiento.

Las ondas acústicas o pulsos pueden usarse para regular la temperatura de las disoluciones en la cámara de tratamiento. A baja potencia, la energía acústica produce una baja agitación sin calentamiento marcado. Aunque se absorbe energía para inducir la agitación, el calor puede perderse rápidamente a través de los laterales de la cámara

de tratamiento, dando como resultado un aumento de la temperatura de equilibrio insignificante en la muestra. A energías superiores, se absorbe más energía, y la temperatura aumenta. El grado de aumento por unidad de aporte de energía puede verse influido y/o controlarse mediante varias características, incluyendo el grado de absorción de calor por la muestra o la cámara de tratamiento y la velocidad de transferencia de calor desde la cámara de tratamiento hasta las zonas circundantes (por ejemplo, el medio de acoplamiento). Adicionalmente, el protocolo de tratamiento puede alternar un intervalo de tratamiento de alta potencia, en el que se obtienen los efectos deseados, con un intervalo de mezclado de baja potencia, en el que se logran la propagación acústica y convección sin generación de calor significativa. Esta convección puede usarse para promover un enfriamiento o intercambio de calor eficaz.

Puede requerirse que la temperatura de la muestra se mantenga dentro de un intervalo de temperatura dado durante un procedimiento de tratamiento. La temperatura puede monitorizarse de manera remota mediante, por ejemplo, un sensor de infrarrojos. Sondas de temperatura tales como termopares pueden no ser particularmente muy adecuadas para todas las aplicaciones porque el haz de sonido puede interactuar con el termopar y generar una temperatura artificialmente alta en las proximidades de la sonda. La temperatura puede monitorizarse mediante el mismo ordenador que controla la forma de onda acústica. El control responde a una señal de error que es la diferencia entre la temperatura real medida de la muestra y la temperatura objetivo de la muestra. El algoritmo de control puede ser como un controlador bang-bang histerético, tal como los de hornillos de cocina, en donde, como emisión del sistema de control, la energía acústica se apaga cuando la temperatura real excede una primera temperatura objetivo y se enciende cuando la temperatura real desciende por debajo de una segunda temperatura objetivo que es menor que la primera temperatura objetivo. Pueden implementarse controladores más complicados. Por ejemplo, en vez de simplemente apagar y encender la señal acústica, podría modularse de manera continua la señal acústica proporcionalmente a la señal de error, por ejemplo, variando la amplitud o el ciclo de trabajo, para proporcionar una regulación de la temperatura más fina.

En la aplicación de un algoritmo de control bang-bang para un formato de múltiples muestras, una vez que se ha excedido un valor de temperatura máxima y la energía sónica se apaga para una muestra particular, una alternativa a esperar a que la muestra se enfríe por debajo de una temperatura seleccionada antes de encender de nuevo la energía sónica, es desplazarse hasta la siguiente muestra, o aumentar la velocidad de flujo de nuevo material de muestra al interior de la cámara de tratamiento. Otra alternativa es cambiar a una forma de onda de "enfriamiento" predefinida que promueve la convección sin añadir calor significativo a una muestra particular, y sincronizar este ciclo con la introducción de nuevo material de muestra en la cámara.

MÁS REALIZACIONES

Los aspectos de la presente divulgación que se refieren a la formación reproducible de grandes volúmenes de partículas nanocrystalinas a través del crecimiento cristalino pueden usarse en combinación con la descripción adicional a continuación que se refiere a tratar material con energía acústica, incluyendo sistemas en los que el material de muestra está contenido dentro o fluye a través de una zona de procesamiento de una cámara.

En alguna realización, el procesamiento de flujo pasante tal como se describe en el presente documento puede permitir algunos tipos de tratamiento acústico y/o eficacias de tratamiento que no son posibles con técnicas de flujo no pasante. En algunas realizaciones, un método de tratar acústicamente un material de muestra incluye crear una o más zonas focales secundarias en una cámara de tratamiento, y usar esas zonas focales secundarias para ayudar a tratar acústicamente el material en la cámara. Por ejemplo, una fuente de energía acústica puede crear una zona focal de energía acústica enfocando la energía emitida por un transductor acústico en una ubicación en una cámara de tratamiento que contiene material de muestra. La energía acústica que se dispersa o emana de otra forma de la zona focal puede reflejarse o manipularse de otra forma (por ejemplo, mediante la geometría definida por la pared de la cámara) para crear zonas focales secundarias o reflexiones de vuelta al interior de la cámara de tratamiento estableciendo de ese modo un entorno de caída de presión, sin contacto que ayuda al mezclado. Estas zonas focales secundarias pueden ayudar al tratamiento acústico, tal como induciendo mezclado, alteración de los enlaces moleculares, flujo del material de muestra en una dirección deseada, etc. Por tanto, el tratamiento acústico puede hacerse más eficaz, por ejemplo, en parte porque la energía sónica que de lo contrario se emitiría desde la cámara de tratamiento puede usarse para el tratamiento acústico en la cámara.

En algunas realizaciones, estas energías reflejadas se dirigen al interior para crear una "zona" de proceso, donde las energías se dirigen a una región de proceso. La conformación de las geometrías de la cámara puede modificarse para alojar un intervalo de presiones dentro de esta zona de proceso. Esto puede ser deseable para determinados materiales tales como muestras biológicas, donde una zona de proceso más uniforme mayor crea un procesamiento globalmente más eficaz puesto que la densidad de energía a través de un volumen integrado mayor de material está por encima de un determinado umbral.

En una realización, un método de tratamiento acústico incluye proporcionar una muestra que va a tratarse acústicamente al interior de un volumen interno de una cámara que tiene una pared con un lado interno. La muestra puede incluir cualquier material adecuado, tal como un líquido, sólido, mezclas, suspensiones u otras combinaciones de líquidos y sólidos, etc. La cámara puede tener cualquier tamaño, conformación u otra disposición adecuada, por

ejemplo, puede ser un único recipiente aislado o una disposición que permite el flujo de material a través de un espacio. Puede transmitirse energía acústica, que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz, desde una fuente de energía acústica que está separada de la cámara. Por ejemplo, puede usarse un transductor acústico que incluye uno o más elementos piezoeléctricos para emitir ondas acústicas que tienen una disposición adecuada para formar una zona focal al menos parcialmente dentro de la cámara. La energía acústica puede transmitirse a través de un medio de acoplamiento, tal como un líquido y/o sólido, hasta el volumen interno. La energía acústica que podría salir de otra forma de la cámara puede reflejarse para formar una zona focal secundaria en la cámara. Por ejemplo, la cámara puede incluir una pared que es delgada, sustancialmente transparente a la radiación acústica y rodeada por aire u otro gas para proporcionar una superficie de contacto de gas/pared de la cámara. En esta realización, la superficie de contacto de gas/pared de la cámara puede proporcionar una diferencia adecuada en la impedancia acústica u otra propiedad acústica en relación con el material de muestra de modo que la energía acústica se refleja en la superficie de contacto de gas/pared de la cámara y de vuelta al interior del volumen interno de la cámara. Esta energía reflejada puede enfocarse o dirigirse de otra forma para formar una o más zonas focales secundarias en la cámara. En una realización alternativa, el propio material de la pared de la cámara podría estar hecho de un material de alta impedancia, provocando así una reflexión directa de vuelta al interior de la zona de procesamiento.

En otra realización ilustrativa, un sistema para tratar un material con energía acústica incluye una cámara que tiene una pared con un lado interior que define un volumen interno y dispuesta para provocar la reflexión de la energía acústica en la cámara para formar una zona focal secundaria en la cámara. Una fuente de energía acústica puede estar separada de la cámara y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno. Un medio de acoplamiento, por ejemplo, que incluye un líquido y/o un sólido, puede estar dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta el volumen interno. La cámara puede tener una abertura al interior del volumen interno (por ejemplo, en el fondo de la cámara), una entrada para recibir un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno. En una realización, la pared de la cámara puede ser sustancialmente transparente a la energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz. Puede proporcionarse una ventana en la abertura de la cámara y estar dispuesta para cerrar de manera sellante la abertura y transmitir energía acústica enfocada al interior de la cámara para el tratamiento de material en el volumen interno. La ventana, que puede estar formada unitariamente, de manera integral o de otra forma con la pared de la cámara, puede ser generalmente transparente a la energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz. Puede estar unida una carcasa a la cámara y la ventana de modo que la ventana está expuesta en un extremo inferior de la carcasa, y la cámara está ubicada en un espacio interior de la carcasa. Esta disposición puede permitir que la carcasa mantenga el contacto de un lado exterior de pared de la cámara con un gas en regiones por encima de la ventana, por ejemplo, donde el extremo inferior de la carcasa y la ventana están sumergidos en un medio de acoplamiento líquido. Una superficie de contacto entre la pared de la cámara y el gas puede tener un efecto de enfoque sobre la energía acústica en el volumen interno para crear una o más zonas focales secundarias de energía acústica en el volumen interno. Por ejemplo, energía acústica que se dispersa o se emite de otra forma desde la zona focal creada por la fuente de energía acústica puede reflejarse por la superficie de contacto de vuelta al interior del volumen interno para la creación de la(s) zona(s) focal(es) secundaria(s). La cámara puede tener una conformación de cúpula, por ejemplo, que incluye una porción semiesférica, porción cilíndrica, porción cónica u otra conformación adecuada para ayudar a enfocar o dirigir de otra forma la energía sónica. En una realización, puede estar ubicada una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno en la porción más superior de la cámara, por ejemplo, para ayudar a eliminar el gas del volumen interno que se libera durante el tratamiento acústico. Esto puede ayudar a impedir la interferencia del gas en la cámara con la energía acústica. Adicionalmente, puede garantizar que partículas más grandes/más pesadas permanezcan en la zona de proceso hasta que sean lo suficientemente pequeñas como para flotar y trasladarse con la muestra que sale.

En una realización, la entrada a la cámara puede cruzar la parte superior de la cámara, pero tener un tubo de entrada que se extiende en el interior de la cámara hasta la región inferior, garantizando por tanto que el material debe pasar a través de la zona de procesamiento en su camino hasta la salida. Esta disposición puede ser más importante en condiciones de procesamiento de bajo flujo y/o baja energía acústica.

En otro aspecto de la invención, un sistema para tratar un material con energía acústica puede incluir una cámara que tiene una pared con un lado interior que define un volumen interno y un lado exterior opuesto al lado interior que está sustancialmente rodeado de un gas. Una superficie de contacto del gas con el lado exterior de la pared de la cámara puede ayudar a reflejar o dirigir de otra forma la energía acústica de la salida de la cámara y/o a crear una o más zonas focales secundarias. Esta zona focal secundaria formada por energía acústica reflejada puede complementar la zona focal creada por la fuente de energía acústica, por ejemplo, para ayudar en el tratamiento acústico del material de muestra. En una realización ilustrativa, la cámara puede tener una conformación de cúpula, por ejemplo, con la porción superior de la cúpula dispuesta en una parte superior de la cámara y lo más alejada de la fuente de energía acústica. La conformación de cúpula de la cámara puede estar dispuesta para enfocar o dirigir de otra forma la energía acústica para formar una zona focal secundaria. La cámara puede tener una abertura al interior del volumen interno, una entrada para recibir un flujo de entrada de material al interior del volumen interno y una salida para descargar un flujo de salida de material del volumen interno. En una realización, la pared de la cámara

puede ser sustancialmente transparente a la energía acústica teniendo una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz, tiene un grosor de aproximadamente 0,010 pulgadas y puede estar hecha de un polietileno, PET, a base de teflón/FEP, TPX (polimetilpenteno), u otro material adecuadamente transparente de manera acústica. Puede estar ubicada una ventana en la abertura de la cámara y estar dispuesta para sellar estrechamente la abertura y para transmitir energía acústica enfocada al interior de la cámara para el tratamiento del material en el volumen interno. La ventana puede ser generalmente transparente a la energía acústica teniendo una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz, por ejemplo, para ayudar a prevenir la pérdida de energía acústica, calentamiento de la ventana, etc. Una fuente de energía acústica puede estar separada de la ventana y la cámara y dispuesta para emitir energía acústica que tiene una frecuencia de aproximadamente 100 kHz a 100 MHz para crear una zona focal de energía acústica en el volumen interno. Un medio de acoplamiento, por ejemplo, que incluye un líquido y/o un sólido, puede estar dispuesto para transmitir energía acústica desde la fuente de energía acústica hasta la ventana. En una realización, la ventana puede estar en contacto con el medio de acoplamiento, por ejemplo, la ventana y otras porciones inferiores de la cámara pueden estar sumergidas en un baño de agua. Una carcasa puede estar unida a la cámara y la ventana de modo que la ventana esté expuesta en un extremo inferior de la carcasa y la cámara esté ubicada en un espacio interior de la carcasa. Esta disposición puede permitir que parte de la carcasa esté sumergida en un medio de acoplamiento líquido, colocando la ventana en contacto con el medio de acoplamiento. Sin embargo, la carcasa puede mantener un gas en contacto con la pared de la cámara aun cuando partes de la pared de la cámara puedan estar ubicadas por debajo de un nivel superior del medio de acoplamiento. La cámara y la ventana pueden estar dispuestas para mantener un entorno presurizado en el volumen interno, por ejemplo, para ayudar a reducir la cavitación, o para producir un vacío para reducir el contenido de gas en el volumen interno.

En algunas realizaciones, la cámara puede estar sellada y tener una o más entradas y salidas a la cámara para la transferencia eficaz del material de fluido global a través de la cámara. La cámara puede sellarse durante el tratamiento para impedir la contaminación del material de muestra o del entorno. En algunas realizaciones, pueden usarse matrices de cámaras para procesar múltiples corrientes de muestra en paralelo, cuando se necesitan volúmenes muy grandes de muestra, tal como en corrientes de procesos de fabricación. En algunas realizaciones, las cámaras y/u otros componentes que se ponen en contacto con un material procesado pueden estar hechas de una manera desechable, por ejemplo, para un uso de una vez en el procesamiento de un material y desecharse después de eso. La entrada y salida pueden estar ubicadas cerca de una parte superior de la cámara, y por tanto, el volumen interno de la cámara puede depender, en algún sentido, de la entrada y salida o estar situado de otra forma por debajo de al menos la salida. La entrada y salida pueden incluir cada una un conducto que se extiende lejos de la cámara de modo que puede introducirse material en la cámara aun cuando la cámara pueda estar sellada completamente de otra forma con respecto al entorno externo. El flujo del material puede provocarse mediante una bomba, gravedad u otra fuerza motriz, y los conductos primero y/o segundo pueden estar conectados a un depósito respectivo que sirve para contener material según sea necesario.

Aparato y métodos para tratamiento ultrasónico

La figura 24 muestra una realización de un sistema de tratamiento acústico 1 en el que la energía acústica enfocada generada por una fuente de energía acústica 2 pasa a través de un medio de acoplamiento 4 (que puede incluir un sólido y/o un líquido, tal como agua) hasta una ventana acústica 11 de una cámara 10 y al interior de un volumen interno 12 de la cámara 10 donde está ubicado el material de muestra. El sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir un controlador 20 (por ejemplo, que incluye un ordenador de propósito general programado adecuadamente u otro dispositivo de procesamiento de datos) que recibe información de control (por ejemplo, de uno o más sensores, dispositivos de entrada por el usuario, etc.) y controla de manera correspondiente el funcionamiento de la fuente de energía acústica 2 y/u otros componentes del sistema. Se proporciona material de muestra al interior del volumen interno 12 por medio de una entrada 13, se trata acústicamente en el volumen interno 12, y se retira del volumen 12 por medio de una salida 14.

La fuente de energía acústica 2 puede incluir un transductor de ultrasonidos que proyecta un haz de ultrasonidos enfocado o frente de ondas hacia la ventana 11 de la cámara 10. La ventana 11, que puede cerrar de manera sellante una abertura en la cámara 10, puede ser adecuadamente transparente a, o transmitir de otra forma energía acústica de modo que el haz de ultrasonidos penetra en la ventana 11 formando una zona focal 617 dentro del volumen interno 12 que actúa sobre el material de muestra en la cámara 10. La ventana 11 puede estar configurada para transmitir una cantidad máxima de energía ultrasonora al material en la cámara 10, y/o controlar la transferencia de calor entre el volumen interno 12 y, por ejemplo, un baño de agua externo u otro medio de acoplamiento 4. En determinadas realizaciones, la ventana 11 es de vidrio, zafiro, cuarzo o un polímero tal como una poliimida o polimetilpenteno. La ventana puede tener cualquier conformación adecuada u otra configuración, por ejemplo, puede ser plana (o presentar de otra forma una superficie relativamente plana a la energía acústica incidente), o puede estar curvada de modo que tiene una conformación semiesférica u otra convexa, permitiendo de ese modo que la energía acústica pase en un ángulo de aproximadamente 90 grados desde el campo acústico convergente. En determinadas realizaciones, la ventana 11 está configurada para guiar la energía sónica de una manera preferida en relación con el volumen interno 12, tal como enfocando o desenfocando la energía acústica, a través de un efecto de "lente" provocado por la conformación física de la ventana 11 (tal como un efecto provocado por una conformación cóncava o convexa u otra configuración de la lente). En algunas realizaciones, la ventana 11

tiene una impedancia acústica similar a la del agua (u otro medio de acoplamiento 4) y una absorción acústica relativamente baja. Un material preferido es polimetilpenteno de baja densidad, pero pueden usarse otros polímeros tales como polipropileno, poliestireno, poli(tereftalato de etileno) ("PET"), poliimida y otros polímeros rígidos y flexibles. Si la ventana 11 está formada de un material de película delgada, la película puede ser un laminado para

facilitar la unión térmica a la cámara 10, y/o puede tener un grosor de aproximadamente 0,25 mm. Por ejemplo, la ventana 11 puede unirse de manera sellante a la cámara 10 usando termosellado, adhesivos, abrazaderas mecánicas, u otros elementos de fijación, u otras disposiciones, o puede sellarse usando juntas comunes o conceptos de junta tórica. También pueden emplearse materiales más gruesos, más rígidos para la ventana 11.

La cámara 10 puede incluir una pared con una superficie interior que define el volumen interno 12. En un aspecto de la invención, la pared puede tener una superficie exterior que está sustancialmente rodeada por un gas (tal como aire) u otro material que tiene una impedancia acústica que es significativamente diferente de una impedancia acústica de la pared de la cámara y/o el material de muestra. La pared de la cámara puede estar hecha relativamente delgada, por ejemplo, teniendo un grosor de aproximadamente 0,010 pulgadas, y puede ser sustancialmente transparente de manera acústica. Por tanto, una superficie de contacto entre el gas (u otro material) alrededor de la superficie exterior de la pared de la cámara y la propia pared de la cámara puede funcionar reflejando energía acústica de vuelta al interior del volumen interno 12. En una realización, la energía acústica en el volumen interno 12 puede reflejarse mediante la superficie de contacto gas/pared de la cámara para crear una zona focal secundaria 618 de energía acústica. Esta zona focal secundaria 618 puede ser coincidente con la zona focal 617, o puede estar ubicada separada de la zona focal 617. Además, la zona focal secundaria 618 puede ser más pequeña que, más grande o del mismo tamaño que la zona focal 617, y la pared de la cámara puede estar dispuesta para crear dos o más zonas focales secundarias 618. Alternativamente, la zona focal secundaria puede estar conformada para actuar sobre un mayor volumen de material, creando así una presión integrada superior a través de la región de material. Si se enfoca, la zona focal secundaria 618 puede tener una intensidad de energía acústica que es superior (o inferior) en relación con la intensidad de energía acústica en la zona focal 617. Por ejemplo, si la presión positiva máxima en la zona focal 617 es una presión de aproximadamente 1 MPa (mega Pascal) a aproximadamente 10 MPa, o de aproximadamente 150 PSI (libras por pulgada cuadrada) a aproximadamente 1.500 PSI, la presión positiva máxima en la zona focal secundaria 618 puede ser un 20% mayor que ésta. (Una zona focal es un área en la que la intensidad de energía acústica está dentro de aproximadamente 6 dB de la intensidad acústica máxima). En esta realización ilustrativa, la pared de la cámara incluye una conformación de tipo cúpula que está ubicada cerca de la parte superior de la cámara 10, por ejemplo, una porción lo más alejada de la fuente de energía acústica 2. Se ha encontrado que esta disposición refleja y enfoca adecuadamente la energía acústica formando una única zona focal secundaria 618 que está ubicada por encima de la zona focal 617, y puede ayudar a garantizar que el material de muestra se expone adecuadamente a la energía acústica, por ejemplo, induciendo mezclado en la cámara 10 o a través de otros efectos.

Para ayudar a acoplar acústicamente la cámara 10 con la fuente de energía acústica 2, la ventana 11 puede estar colocada en contacto con el medio de acoplamiento 4, ya sea el medio de acoplamiento 4 líquido o sólido. Cuando el medio de acoplamiento 4 es líquido, pueden hacerse adaptaciones para ayudar a mantener una superficie de contacto gas/pared de la cámara impidiendo que el medio de acoplamiento 4 entre en contacto con porciones de la cámara 10 por encima de la ventana 11. En esta realización ilustrativa, la cámara 10 se recibe en una carcasa 615, tal como una funda cilíndrica, de modo que la ventana 11 se expone en un extremo inferior de la carcasa 615, pero otras porciones de la cámara 10 están ubicadas en el espacio interior de la carcasa 615. Por ejemplo, la ventana 11 puede estar unida o acoplada de otra forma a la carcasa 615 para formar una unión estanca a los líquidos que impide que el medio de acoplamiento 4 líquido fluya al interior del espacio entre la pared de la cámara y la carcasa 615. Esto ayuda a mantener el aire u otro gas alrededor de la pared de la cámara incluso si la ventana 11 y/o porciones de la carcasa 615 están sumergidas por debajo del nivel superior del medio de acoplamiento 4. Es decir, al menos algunas partes de la pared de la cámara, tal como toda la cámara 10, pueden estar ubicadas por debajo de la superficie superior del medio de acoplamiento 4 líquido al tiempo que se mantiene la superficie de contacto gas/pared de la cámara. En la figura 24, sólo una parte inferior de la cámara 10 está situada por debajo de la superficie superior del medio de acoplamiento 4, pero debe entenderse que el nivel superior del medio de acoplamiento 4 puede estar situado de cualquier modo adecuado en relación con la cámara 10.

Por supuesto, la disposición en la figura 24 es sólo una realización ilustrativa, y son posibles otras configuraciones para la cámara 10 y la carcasa 615. Por ejemplo, la figura 25 muestra una disposición en la que la cámara 10 está configurada como la de la figura 24 (teniendo la cámara una pared con una conformación de tipo cúpula). Sin embargo, la carcasa 615 en esta realización tiene una conformación que se adapta generalmente a la de la cámara 10 al tiempo que mantiene sustancialmente un hueco de aire u otro gas entre la cámara 10 y la carcasa 615. No es necesario que el hueco de aire sea particularmente grande, y aunque el hueco puede variar en el grosor, en algunas realizaciones puede ser tan delgado como aproximadamente 1 mm. Obsérvese que la carcasa 615 y la cámara 10 pueden entrar en contacto entre sí o estar unidas eficazmente, por ejemplo, en áreas cerca de la entrada 13 y salida 14, al tiempo que todavía mantienen una condición en la que la pared de la cámara está sustancialmente rodeada por aire u otro gas.

La entrada 13 y salida 14 pueden estar dispuestas en una variedad de formas, y en esta realización la entrada 13 y salida 14 pueden incluir cada una un conducto (tal como un tubo flexible) acoplado a la cámara 10. La entrada 13 y/o

salida 14 pueden estar dotadas de ajustes (tales como ajustes de conexión rápida, ajustes de tipo Luer) u otra disposición adecuada para producir una conexión estanca a los fluidos con un suministro de material de muestra o receptor. El suministro de material de muestra puede incluir, por ejemplo, un depósito de material de muestra, conductos, bombas, filtros y/o cualquier otro componente adecuado. Por ejemplo, en una realización, la entrada 13 y/o salida 14 pueden incluir un tubo flexible que puede interactuar con una bomba peristáltica que provoca que el material de muestra fluya a través de la cámara 10. En algunas realizaciones, la entrada y/o salida pueden incluir una válvula de contención, válvula de una vía, válvulas controladas electrónicamente u otra disposición que ayuda a garantizar que se produzca el flujo de un modo deseado, por ejemplo, de modo que el flujo de material sea siempre desde la entrada hasta la salida incluso aunque el flujo pueda ser intermitente. En algunos casos, el procesamiento acústico del material de muestra puede provocar la liberación de gas desde el material de muestra que puede interferir con el procesamiento acústico. En esta realización, la salida 14 está ubicada en la porción más superior de la cámara 10 de modo que cualquier gas en el volumen interno 12 pueda retirarse con el flujo de material de muestra fuera del volumen interno 12 y al interior de la salida 14. Sin embargo, son posibles otras disposiciones, tal como una trampa de gas, ventilación, eliminador de gas u otra configuración para reducir la presencia de gas en el volumen interno 12. La entrada 13 y/o salida 14 (así como otros componentes que incluyen la cámara 10, la ventana 11 y la carcasa 615) pueden estar hechas de manera que puedan esterilizarse (por ejemplo, mediante óxido de etileno, radiación gamma, esterilización en autoclave, tratamiento químico, etc.) de modo que un usuario puede garantizar que el material de muestra no se contaminará. Además, tales componentes pueden hacerse y estar destinados a un único uso, y posteriormente desecharse o restaurarse.

Una porción de la cámara 10, tal como una porción superior de la cámara 10, puede incluir una ventana de inspección u otra disposición que permita la inspección mediante luz visible del volumen interno 12. Tal inspección puede realizarla un humano, o mediante un sensor 21 dispuesto adecuadamente (véase la figura 24) tal como una cámara de vídeo, un fotodetector, un detector de IR, y así sucesivamente. Las características del material en el volumen interno 12 detectadas mediante el sensor 21 puede usarlas el controlador 20 para controlar la fuente de energía acústica 2 u otros componentes del sistema 1. Por ejemplo, si ha de evitarse una cavitación excesiva, el controlador 20 puede ajustar la energía acústica en la zona focal 617 si el sensor 21 detecta la presencia de burbujas de cavitación de un determinado tamaño y/o número. Pueden detectarse otras características mediante el sensor 21, tal como el tamaño, la densidad u otras características de partículas en la cámara 10 en el caso en el que el tratamiento acústico esté destinado a descomponer el tamaño de las partículas en el material de muestra. Por tanto, el sensor 21 puede detectar si el tratamiento acústico está progresando según se desea y si el procesamiento está completo, por ejemplo, para desencadenar la introducción de material de muestra adicional al interior de la cámara 10. Como la ventana 11, la ventana de inspección puede estar formada de cualquier material adecuado, tal como vidrio, zafiro, cuarzo, y/o materiales poliméricos, y/o puede ser parte de la pared de la cámara. Además, el sensor 21 puede formar parte de la carcasa 615 (por ejemplo, unido a una pared de la carcasa 615) de modo que cuando la carcasa 615 y la cámara 10 se ponen en servicio, el sensor 21 puede estar dispuesto adecuadamente para detectar las condiciones en el volumen interno 12 sin que se requiera ningún ajuste u otra configuración del sensor 21. Pueden establecerse comunicaciones y/o conexión de potencia del sensor 21 con el controlador 20 de manera inalámbrica, o mediante cable, tal como mediante un conector eléctrico en la carcasa 615 que se pone en contacto con un conector homólogo cuando la carcasa 615 se monta en un soporte. Es decir, una máquina de tratamiento acústico que incluye la fuente de energía acústica 2, un recipiente 3 para el medio de acoplamiento 4, el controlador 20, etc. (por ejemplo, como una máquina de tratamiento acústico modelo S2 o modelo S220 ofrecida por Covaris, Inc. de Woburn, MA) también puede incluir un soporte u otra disposición de montaje para acoplarse físicamente con la carcasa 615 y mantener la cámara 10 en una posición apropiada en relación con el medio de acoplamiento 4 y/o la fuente de energía acústica 2. En una realización, el soporte puede incluir una abertura cilíndrica que recibe una porción cilíndrica de la carcasa 615 y mantiene la carcasa 615 en una ubicación deseada. El soporte y la carcasa 15 pueden fijarse en relación entre sí usando una abrazadera, un tornillo de fijación, ajuste de fricción u otra disposición adecuada.

El cuerpo de la cámara 10 puede estar hecho de cualquier material o combinación de materiales adecuados para contener la muestra en el volumen interno 12 durante el tratamiento, para actuar como sello medioambiental y/o para proporcionar una función de reflexión acústica. En algunas realizaciones, la cámara 10 puede estar hecha de un material rígido o flexible, tal como un polímero o metal térmicamente conductor, o una combinación de tales materiales. Preferiblemente, el material usado para la cámara 10 tiene una baja absorción acústica. En determinadas realizaciones, la porción superior de la cámara 10 (por ejemplo, que incluye una ventana de inspección) puede estar dispuesta para reflejar la energía acústica de vuelta al interior del volumen 12 interno (por ejemplo, funcionando con una superficie de contacto de gas), proporcionando eficacias de proceso adicionales. Si la cámara 10 está hecha de múltiples partes, tales como mediante elementos superiores e inferiores, los elementos pueden unirse entre sí mediante unión térmica, unión adhesiva, fijación externa, elementos de sujeción mecánica con una junta tórica u otra junta para formar un sello entre los elementos, soldadura, y así sucesivamente. Si la unión va a lograrse mediante unión térmica, los elementos superior e inferior pueden estar hechos de, o incluir, laminados de película que tienen capas externas que pueden unirse por calor y capas internas resistentes al calor.

El volumen interno 12 puede estar dimensionado y conformado según sea apropiado para el material de muestra que va a tratarse, por ejemplo, algunas aplicaciones de tratamiento acústico (tales como esterilización) pueden funcionar eficazmente si se trata un volumen relativamente pequeño de material de muestra en un volumen

relativamente pequeño, mientras que otras aplicaciones (tales como mezclado) pueden producir mejores resultados usando un mayor volumen para el volumen interno 12. El volumen interno 12 puede tener diferentes conformaciones u otras características de configuración, por ejemplo, el volumen interno 12 puede estar definido por paredes verticales, puede tener una conformación cónica, puede tener una conformación curvada, y así sucesivamente. Además, la cámara 10 puede estar hecha de múltiples componentes tales como un elemento superior y un elemento inferior transparente acústicamente (por ejemplo, ventana 11), y un cuerpo que juntos definen el volumen interno que contiene el material que va a tratarse. Alternativamente, la cámara 10 y ventana 11 pueden estar hechas como una única pieza unitaria o de otros modos.

La figura 26 muestra una vista en perspectiva de la cámara 10 con conformación de cúpula de la realización de la figura 24. Aunque se ha encontrado que una conformación de cúpula curvada con una sección superior semiesférica es útil en la creación de una zona focal secundaria, son posibles otras conformaciones de cúpula. Por ejemplo, la figura 27 muestra una vista en sección transversal de una cámara 10 que tiene una conformación sustancialmente cónica. Una disposición de este tipo puede ser útil, por ejemplo, para enfocar energía acústica cerca de la parte superior de la cámara 10. La figura 28 muestra otra realización ilustrativa en la que la cámara 10 tiene una conformación aproximadamente cilíndrica. Esta disposición puede ser útil para generar múltiples zonas focales secundarias, por ejemplo, cerca de la periferia de la porción superior de la cámara 10. La figura 29 muestra otra realización ilustrativa en la que la cámara tiene una porción inferior con una conformación cónica y una porción superior con una conformación cilíndrica. Esta disposición puede ayudar a crear una zona focal secundaria en un área relativamente confinada cerca de la parte superior de la cámara 10. Por supuesto, las conformaciones de cúpula de las figuras 27-29 podrían modificarse de otros modos, por ejemplo, incluyendo conformaciones tetraédricas, conformaciones ovaladas, conformaciones de cúpula geodésica y otras disposiciones regulares e irregulares. Aunque estas realizaciones se muestran sin una ventana 11 u otra disposición similar, puede proporcionarse una ventana 11 en la abertura inferior de la cámara 10, por ejemplo, uniendo una ventana 11 a la pestaña en el extremo inferior de la cámara 10.

Tal como se comentó anteriormente y se muestra en la figura 24, el sistema de tratamiento acústico 1 puede incluir un recipiente 603 que contiene la fuente de energía acústica 2, la cámara 10, el medio de acoplamiento 4 y/u otros componentes. El recipiente 603 puede adoptar cualquier tamaño, conformación u otra configuración adecuada, y puede estar hecho de cualquier material o combinación de materiales adecuados (tales como metal, plástico, materiales compuestos, etc.). Aunque en esta realización ilustrativa el recipiente 603 tiene una configuración de tipo tarro con una parte superior abierta para permitir el acceso al recipiente 603, el recipiente 603 puede estar dispuesto para tener una tapa u otro cierre. Por ejemplo, la cámara 10, carcasa 615, etc., pueden recibirse en un orificio en una tapa que cierra el recipiente 603 de modo que la cámara 10 está situada adecuadamente al menos parcialmente dentro del recipiente 603. Si el material de acoplamiento 4 es sólido, el recipiente 603 y el medio de acoplamiento 4 pueden estar esencialmente integrados entre sí, funcionando el medio de acoplamiento 4 esencialmente como un acoplamiento acústico así como una unión física de la fuente acústica 2 y la cámara 10 o un soporte para la cámara 10.

Control de la cavitación

En algunas aplicaciones, puede ser preferible tratar la muestra con tanta energía como sea posible sin provocar cavitación. Este resultado puede lograrse suprimiendo la cavitación. La cavitación puede suprimirse presurizando la cámara de tratamiento por encima de la presión ambiental, también conocido como "sobrepresión", hasta el punto en el que no se desarrolla presión negativa durante la fase de rarefacción de la onda acústica. Esta supresión de la cavitación es beneficiosa en aplicaciones tales como transformación de células donde el efecto deseado es abrir las membranas celulares al tiempo que se mantienen células viables. En otras aplicaciones puede ser deseable potenciar la cavitación. En estas aplicaciones, puede aplicarse una sobrepresión "negativa" o vacío a la región de la zona focal.

El control de la cavitación en la muestra también puede ser importante durante los procesos de tratamiento acústico. En algunos escenarios, la presencia de pequeñas cantidades de cavitación puede ser deseable para potenciar procesos bioquímicos; sin embargo, cuando existen grandes cantidades de burbujas de cavitación pueden dispersar el sonido antes de que alcance la diana, protegiendo eficazmente la muestra.

La cavitación puede detectarse mediante una variedad de métodos, incluyendo métodos acústicos y ópticos. Un ejemplo de detección acústica es un detector de cavitación pasiva (PCD) que incluye un transductor externo que detecta emisiones acústicas de burbujas de cavitación. (Es decir, el PCD puede ser externo a la cámara 10, por ejemplo, el PCD puede estar ubicado en el medio de acoplamiento 4). La señal del PCD puede filtrarse, por ejemplo usando un detector de picos seguido por un filtro de paso bajo, y luego introducirse en un ordenador de control (parte del controlador 20) como una medida de la actividad de cavitación. La señal acústica podría ajustarse de formas similares a las descritas en el ejemplo de control de la temperatura para mantener una actividad de cavitación en un nivel deseado.

Sobrepresión: El aumento de la presión en la cámara 10 es una técnica para controlar la cavitación. La sobrepresión tiende a eliminar los núcleos de cavitación y aumenta el nivel de energía requerido para crear cavitación. Las notas

en el fluido se ven fuertemente afectadas por la sobrepresión y de ese modo la cavitación en el fluido libre se ve a menudo drásticamente reducida, incluso mediante la adición de una atmósfera de sobrepresión. Los sitios de nucleación en las paredes de la cámara 10 tienden a ser más resistentes a la sobrepresión; sin embargo la cavitación tiende a estar restringida a estos sitios y cualquier burbuja de gas que flota libre en el fluido libre se disuelve rápidamente. Aumentando la presión ambiental del sistema, las presiones requeridas para la nucleación y el colapso de burbujas aumentan, aumentando por tanto la fuerza conferida por el colapso de la burbuja de cavitación. Esta relación es aproximadamente lineal, es decir, la duplicación de la presión ambiental del sistema duplica la fuerza resultante del colapso de las burbujas. Un diseño cuidadoso del sistema para adaptar presiones globales superiores puede permitir que esto se amplíe a escala en muchos factores. Puede aplicarse sobrepresión a la cámara de tratamiento, una matriz de cámaras de tratamiento, el medio de acoplamiento de tratamiento y el recipiente, o a todo el sistema para lograr una presión superior a la atmosférica en la región de la zona focal.

Desgasificación: La reducción del contenido de gas del fluido del material tiende a reducir la cavitación, reduciendo de nuevo los núcleos de cavitación y haciendo más difícil iniciar la cavitación. Otro método de control de la cavitación o los efectos de la cavitación es controlar los gases que se disuelven en el fluido de muestra. Por ejemplo, la cavitación provoca menos daño mecánico en fluido saturado con gas helio que en fluido saturado con gas argón.

Monitorización de la cavitación

Puede emplearse una variedad de métodos para detectar la cavitación. Por ejemplo, pueden usarse emisiones acústicas, dispersión óptica, fotografía de alta velocidad, daño mecánico y productos sonoquímicos. Tal como se describió anteriormente para monitorizar la temperatura, puede usarse la información de la detección de cavitación mediante el sistema para producir una emisión que controla selectivamente la exposición de una muestra a energía sónica en respuesta a la información. Cada uno de estos métodos para monitorizar la cavitación se describe más completamente a continuación.

Emisiones acústicas: Las burbujas son elementos de dispersión eficaces de los ultrasonidos. El modo de pulsación de una burbuja se denomina fuente de monopolo, que es una fuente acústica eficaz. Para oscilaciones pequeñas, generalmente lineales, la burbuja simplemente dispersa el pulso acústico incidente. Sin embargo, a medida que la respuesta se vuelve menos lineal, también comienza a emitir señales a armónicos superiores. Cuando se accionan más fuertemente, las burbujas comienzan a generar subarmónicos también. Finalmente, a medida que la respuesta se vuelve periódica o caótica, el campo dispersado tiende hacia el ruido blanco. En el escenario en el que se producen colapsos inerciales, se emiten pulsos de presión acústica cortos. Un transductor acústico puede estar configurado para detectar estas emisiones. Hay una correlación detectable entre el comienzo de las emisiones y la alteración de las células.

Dispersión óptica: Las burbujas también dispersan la luz. Cuando están presentes burbujas, la luz se dispersa. Normalmente puede introducirse luz en el sistema usando fuentes de luz de fibra óptica de modo que puede detectarse la cavitación en tiempo real, y por tanto puede controlarse mediante sistemas electrónicos e informáticos.

Fotografía de alta velocidad: Las burbujas pueden fotografiarse. Este método requiere normalmente cámaras de alta velocidad e iluminación de alta intensidad, porque las burbujas responden en el marco temporal de la acústica. También requiere un buen acceso óptico a la muestra en estudio. Este método puede proporcionar datos detallados y precisos y puede ser una consideración cuando se diseñan sistemas según la invención. Los sistemas estroboscópicos, que toman imágenes mucho menos frecuentemente, pueden proporcionar a menudo un rendimiento cualitativo similar de manera más barata y fácil que la fotografía de alta velocidad.

Daño mecánico: Se sabe que la cavitación crea daño a los sistemas mecánicos. La picadura de láminas metálicas es un efecto particularmente común, y un método de detección. Hay una correlación entre la cavitación necesaria para picar láminas y para alterar células.

Productos sonoquímicos: Se sabe que se producen varios productos químicos en respuesta a la cavitación. La producción de estos productos químicos puede usarse como una medida de la actividad de cavitación. Una técnica común es monitorizar la generación de luz a partir de productos químicos, tales como luminol, que generan luz cuando se exponen a cavitación. La producción de productos sonoquímicos habitualmente no puede realizarse durante experimentos con células pero puede realizarse independientemente en condiciones idénticas, y de ese modo, proporcionar un patrón calibrado.

Materiales para tratamiento

A. Materiales biológicos

Pueden tratarse muchos materiales biológicos según la presente invención. Por ejemplo, tales materiales para tratamiento incluyen, sin limitación, tejido vegetal en crecimiento tales como puntas de raíz, meristemo y callo, hueso, levaduras y otros microorganismos con paredes celulares fuertes, células bacterianas y/o cultivos en placas de agar o en medio de crecimiento, células madre o sanguíneas, hibridomas y otras células de líneas celulares

inmortalizadas, y embriones. Adicionalmente, otros materiales biológicos, tales como suero y preparaciones de proteína, pueden tratarse con los procedimientos de la invención, incluyendo esterilización.

B. Materiales de unión

Muchas reacciones de unión pueden potenciarse con tratamientos según la invención. Las reacciones de unión implican unir entre sí dos o más moléculas, por ejemplo, dos moléculas de ácido nucleico, mediante hibridación u otra unión no covalente. Se encuentran reacciones de unión, por ejemplo, en un ensayo para detectar la unión, tal como una reacción de tinción específica, en una reacción tal como la reacción en cadena de la polimerasa donde una molécula de nucleótido es un cebador y la otra es una molécula sustrato que va a replicarse, o en una interacción de unión que implica un anticuerpo y la molécula a la que se une, tal como un inmunoensayo. Las reacciones también pueden implicar la unión de un sustrato y un ligando. Por ejemplo, puede inmovilizarse un sustrato tal como un anticuerpo o receptor sobre una superficie de soporte, para su uso en técnicas de purificación o separación de epítomos, ligandos y otras moléculas.

C. Materiales químicos y minerales

Pueden tratarse materiales orgánicos e inorgánicos con pulsos acústicos controlados según los métodos de la invención. Los pulsos sónicos pueden usarse para triturar un material sólido, particularmente en un régimen de control por retroalimentación, o en matrices de múltiples muestras. Como con las muestras biológicas, las muestras orgánicas e inorgánicas individuales en una matriz pueden tratarse en aislamiento sustancial del entorno de laboratorio. Además de alterar su integridad física, los materiales pueden disolverse en fluidos de disolvente, tales como líquidos y gases, o extraerse con disolventes. Por ejemplo, la disolución de polímeros en disolventes puede ser muy lenta sin agitación, pero la agitación de múltiples muestras con métodos actuales es difícil y genera la posibilidad de contaminación cruzada entre muestras. Sin embargo, la agitación de múltiples muestras sin contaminación cruzada entre muestras puede lograrse con un aparato y métodos de la presente invención.

Aplicaciones de tratamiento

A. Alteración de la accesibilidad celular

Los sonicadores pueden romper las células usando frecuencias de alrededor de 20 kHz. Se cree generalmente que hay dos formas en las que los ultrasonidos pueden afectar a las células, concretamente mediante calentamiento y mediante cavitación, que es la interacción de la onda sonora con burbujas de gas pequeñas en la muestra. El calentamiento se produce principalmente debido a la absorción de la energía sonora por el medio o por el recipiente. Para sistemas acuosos diluidos, es la absorción por el recipiente la que es una fuente principal del calentamiento. No es deseable el calentamiento en algunas aplicaciones de tratamiento, tal como se describe en el presente documento. El calentamiento asociado con la compresión y el enfriamiento asociado con la rarefacción de una onda sonora es relativamente pequeño, incluso para sonido intenso.

Según la invención, se usan pulsos sónicos controlados en un medio para tratar una muestra que contiene material biológico. Los pulsos pueden estar específicamente adaptados para interaccionar preferentemente con matrices de soporte en un material biológico, tal como paredes de células vegetales o matrices extracelulares tales como hueso o colágeno, reduciendo o eliminando de ese modo una función de barrera de tales matrices y facilitando la inserción de componentes extracelulares al interior de una célula. En esta aplicación, la célula se ve mínimamente alterada y se conserva la viabilidad celular. Estos pulsos pueden estar provocados por ondas de choque o por ondas sonoras. Las ondas pueden crearse externas a la muestra, o directamente en la muestra, por medio de dispositivos mecánicos aplicados. En experimentos en los que los efectos térmicos son insignificantes, normalmente no hay lisis, a menos que esté presente la cavitación. Otros modos de energía sónica pueden tener diferentes efectos que romper una matriz y pueden usarse o bien con pretratamiento, con energía sónica disruptiva, o bien por sí mismos. Por ejemplo, las condiciones para romper una matriz pueden ser diferentes de aquellas para permeabilizar una membrana celular.

Hay muchos posibles mecanismos mediante los cuales la cavitación puede afectar a las células y no existe consenso en cuanto a qué mecanismos, si hay alguno, prevalecen. Se cree que los principales mecanismos incluyen cizalladura, microchorros, ondas de choque, sonoquímica y otros mecanismos.

B. Extracción

En una variación del método para alterar la accesibilidad celular descrito anteriormente, pueden usarse pulsos controlados en un medio para tratar una muestra que contiene material biológico para extraer una fracción o fracciones del material biológico. Los pulsos están específicamente adaptados para interaccionar preferentemente con matrices de soporte, tales como paredes de células vegetales o matrices extracelulares tales como hueso o colágeno, o materiales que tienen diferencias en rigidez o permeabilidad en un material biológico, reduciendo o eliminando de ese modo una función de barrera de tales matrices o materiales. Estos pulsos pueden estar provocados por ondas de choque o por ondas sonoras. Las ondas pueden crearse externas a la muestra, o

directamente en la muestra, a través de medios mecánicos aplicados.

La matriz de soporte de una muestra biológica puede romperse sin romper una o más estructuras internas seleccionadas de las células contenidas dentro de la matriz. Ejemplos representativos de tales muestras son: i) hueso, en el que una matriz rígida contiene células vivas de interés; ii) muestras de tejido de mamíferos, que contienen células vivas incrustadas en una matriz de tejido conjuntivo elástico y "glicocálix" o matriz intracelular; y iii) tejidos vegetales, tales como hojas, que contienen células en una matriz de celulosa, a menudo reticulada con otros materiales, de rigidez moderada. Prácticamente todas las células vivas son de textura gelatinosa, y pueden deformarse en algún grado sin rotura o daño interno. En cambio, las matrices están diseñadas para soportar y proteger las células, así como para lograr otras funciones biológicas. En los tres ejemplos anteriores, las matrices de huesos y hojas están diseñadas para proporcionar rigidez a la estructura, mientras que el soporte de la mayoría de las matrices colagenosas tiene un carácter fuertemente elástico. Por tanto, pueden usarse diferentes protocolos por ejemplo, amplitud, duración, número de pulsos y temperatura de la muestra, para romper diferentes matrices por medios mecánicos sin dañar el material celular.

Tres áreas para optimizar la extracción son la forma de onda de tratamiento, forma de onda de mezclado y posicionamiento u oscilación. Un método para determinar los parámetros de tratamiento y posicionamiento apropiados para una muestra diana para fines de extracción se describe a continuación.

En primer lugar, se coloca una muestra sólida en un volumen de líquido en aproximadamente una razón 1:1 (peso/volumen), en una cámara de tratamiento. Por ejemplo, se añaden 0,25 ml de metanol a 0,25 g de tejido de hoja en una cámara de tratamiento de 0,5 ml. Se coloca una única muestra dentro de la zona focal del aparato sónico. Sin usar el protocolo de tratamiento, se ajusta la forma de onda de mezclado para proporcionar "agitación" de la muestra a la amplitud más baja, los menores ciclos/estallido y el ciclo de trabajo más bajo. Tras definirse el protocolo de forma de onda de mezclado, se ajusta la forma de onda de tratamiento de rotura inmovilizando la muestra diana en la zona focal de manera que no hay mezclado y ni movimiento de la muestra, tal como oscilación. Usando una fuente de energía sónica tal como un transductor piezoeléctrico, se somete la muestra a un número mínimo de ciclos por estallido, por ejemplo, tres. Para fines de extracción, se usa la amplitud inicialmente con un parámetro de 500 mV nominal. Se trata una porción de la muestra y se inspecciona bajo un microscopio para detectar signos de rotura de la membrana. Tal inspección puede realizarse conjuntamente con tintes que tiñen orgánulos intracelulares. El número de ciclos/estallido se aumenta entonces hasta que se logra un nivel de rotura de tejido deseado particular en la porción inmovilizada de tejido. Con una muestra nueva, y con una razón 1:1 de tejido con respecto a líquido, se monitoriza la temperatura de la muestra durante un tratamiento total de un millón de ciclos con un sensor infrarrojo dirigido a la parte superior de la película de polietileno delgada que cubre el recipiente de la muestra. El ciclo de trabajo se ajusta para mantener la temperatura dentro de intervalos predefinidos, tales como 4°C dentro de +/-2°C. Tal como se comentó anteriormente, las diferentes fases de extracción pueden realizarse con diferentes cámaras de tratamiento dispuestas en serie (como en la figura 23) o con la misma cámara (por ejemplo, cuando el material fluye de una manera oscilante a través de la cámara 10). Las diferentes cámaras, o condiciones de tratamiento, pueden ajustarse para lograr el resultado deseado para cada fase en el proceso.

C. Introducción de una molécula al interior de o retirada de una molécula de una célula

Una vez que una muestra que tiene una matriz se ha debilitado o atenuado suficientemente, pero no hasta el punto en el que un número sustancial de células contenidas dentro de la matriz se destruyen o lisan, una célula o células diana expuestas se vuelven propensas a la inserción de moléculas exógenas mediante técnicas tales como transfección o transformación. Con algunas matrices, puede ser conveniente aislar las células de las matrices y luego transfectar las células. En otros casos, será preferible, particularmente en un sistema automatizado, realizar la transfección directamente sobre la muestra tisular tratada, usando disoluciones y condiciones adaptadas a partir de técnicas conocidas. Alternativamente, en situaciones en las que una célula que va a tratarse no está situada dentro de una matriz, la célula puede tratarse directamente según el proceso a continuación sin tener que tratar previamente la matriz. Aunque el tratamiento a continuación se describe principalmente para la transfección, los métodos y el aparato según la presente invención son igualmente aplicables a un proceso de transformación u otros procesos para introducir un material exógeno al interior de una membrana celular permeabilizada.

Las formas de onda usadas para alterar la permeabilidad de una célula se refinan dependiendo de la aplicación particular. Normalmente, la onda de choque se caracteriza por un frente de ondas de choque rápido con una presión positiva máxima, por ejemplo aproximadamente 100 MPa, y una presión negativa máxima, por ejemplo aproximadamente menos 10 MPa. Esta forma de onda es de unos pocos microsegundos de duración, del orden de aproximadamente 5 microsegundos. Si el pico negativo es mayor de aproximadamente 1 MPa, pueden formarse burbujas de cavitación. La formación de burbujas de cavitación también depende del medio circundante. Por ejemplo, el glicerol es un medio inhibidor de la cavitación; mientras que el agua líquida es un medio promotor de la cavitación. El colapso de las burbujas de cavitación forma "microchorros" y turbulencia que inciden sobre el material circundante.

Las ondas sonoras, concretamente ondas acústicas a intensidades por debajo del umbral de choque, proporcionan un medio alternativo de rotura de la matriz para permitir el acceso a las membranas plasmáticas de las células para

permitir la transformación. Tales ondas sonoras pueden generarse mediante cualquier proceso conocido. Como el material biológico se somete a temperaturas por debajo de cero, por ejemplo aproximadamente menos 5°C, la mayoría pero no toda el agua está en la fase sólida. Sin embargo, en determinados tejidos biológicos todavía permanecen microdominios de agua líquida por varios motivos, tales como moléculas "anticongelantes" naturales o regiones de concentración de sal mayor. Por tanto, puesto que la temperatura de una muestra varía durante el tratamiento con ondas de choque o sonoras, los microdominios de agua líquida son capaces de formar ondas de choque e inducir la formación de burbujas de cavitación y su colapso, con el estrés por cizalladura resultante que incide sobre los tejidos circundantes. De hecho, la alteración gradual de la temperatura de la muestra puede ser deseable, ya que proporciona dominios enfocados de agua líquida para su incidencia sobre el material circundante. Las ondas pueden aplicarse a las muestras o bien directamente, como pulsos piezoeléctricos, o bien a través de un medio intermedio. Este medio puede ser agua, tampón, medio estabilizador para el material diana que va a aislarse, o medio de extracción para la diana. Un medio intermedio también puede ser un sólido, formado por un material que es intrínsecamente sólido, o de una disolución congelada.

En ese punto, o, de manera opcional, previamente, se añade a la muestra una disolución o suspensión que contiene el material que va a incorporarse al interior de las células. En una realización, el material exógeno se incorpora al interior de las células de una manera convencional, tal como se conoce en la técnica para células con membranas plasmáticas expuestas. En otra realización, se usa energía acústica para permeabilizar transitoriamente una membrana plasmática para facilitar la introducción de materiales exógenos en las células. El material exógeno puede estar presente en la muestra durante el debilitamiento de la matriz mediante energía acústica. Aun cuando las células permanezcan intactas, tal como se determina mediante exclusión de tinte u otras mediciones de viabilidad, el proceso de debilitamiento de la matriz celular mediante energía acústica desestabiliza transitoriamente las membranas plasmáticas, aumentando la captación de macromoléculas y estructuras exógenas. Si es necesario un aumento adicional en la velocidad de incorporación, entonces se aumenta ligeramente la intensidad o el tiempo de aplicación de la energía acústica hasta que la membrana celular se vuelve permeable transitoriamente. Por ejemplo, se aplica una onda o pulso suave a la mezcla, con una amplitud predeterminada. Esta amplitud puede determinarse fácilmente en experimentos separados sobre muestras del mismo tipo para hacer transitoriamente que una membrana plasmática de un tipo de célula sea porosa, de una manera empírica similar a las etapas descritas anteriormente para determinar un tratamiento apropiado para romper la matriz. Durante el estado poroso transitorio, los materiales exógenos difunden al interior de la célula y los materiales quedan atrapados allí una vez que se retira el pulso de choque o sónico.

Una ventaja principal de estos métodos para la transfección, u otra incorporación de material exógeno al interior de células vivas, es que los métodos son fácilmente propensos a ampliación a escala, a automatización y a una reducción marcada en el tamaño de muestra y volumen de reactivos. Por tanto, los métodos pueden adaptarse a automatización a gran escala, en gran parte debido a que no requieren el aislamiento de las células de su matriz. Adicionalmente, estos métodos son propensos a un proceso de flujo continuo tal como los descritos en el presente documento. Por ejemplo, el tratamiento con energía sónica puede ser diferente para la permeabilización que para la esterilización, pero la muestra que va a tratarse puede hacerse fluir a través de un aparato similar al descrito en la figura 21.

El número de células por ml de medio también es un factor importante para aplicaciones celulares ya que para usar la acústica eficazmente la concentración de las células no debe ser demasiado baja (ya que la energía generada y utilizada depende de la concentración de las células) ni demasiado alta (la viscosidad es alta). Adicionalmente, con el proceso de permeabilización y con el perfil de mezclado, pueden aumentarse otras técnicas de transferencia génica. Los ejemplos incluyen coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación y procesos dependientes de receptor.

D. Esterilización

Los términos "esterilizar", "desinfectar", "conservar", "descontaminar", "inactivación", "desinfectar" y "destruir" se usan de manera intercambiable en el presente documento, a menos que el contexto demande otra cosa. "Esterilización", concretamente la destrucción de todos los organismos, puede no ser un sinónimo en determinadas operaciones de "descontaminación", por ejemplo, cuando el contaminante no está vivo, tal como una proteína o prión. Estos términos, normalmente, significan la eliminación sustancial de o la interferencia con cualquier actividad de un organismo y/o partícula particular.

Los métodos para la permeabilización y extracción, descritos anteriormente, pueden modificarse para esterilizar una muestra. El aparato y los métodos para esterilizar pueden optimizarse para lograr una esterilización eficaz de materiales particulares en volúmenes y recipientes particulares. Para un material particular que va a esterilizarse, se selecciona un conjunto inicial de condiciones. Tales condiciones pueden incluir la selección de un tipo de generador de pulsos sónicos, la intensidad de energía sónica, la frecuencia de energía sónica, cuando sea relevante, y/o variables similares. Las condiciones también pueden incluir el volumen, el modo de transporte y/o la exposición de los materiales que van a esterilizarse. Entonces, las condiciones iniciales y variantes cercanas se aplican a la muestra, y se determina el porcentaje de células o virus destruidos mediante condiciones de ensayo convencionales. Se seleccionan variables adicionales para cambiarlas. Por consiguiente, se encuentra una zona de destrucción

máxima del organismo de prueba. Finalmente, otras variables, tales como velocidad de flujo y/o longitud y/o intensidad de exposición sónica, se optimizan para proporcionar tanto una solución técnica como una solución comercialmente útil al problema de esterilizar un material particular. Cualquiera de estos valores determinados empíricamente puede programarse en un sistema de control de un aparato usado para la esterilización para controlar activamente la esterilización, o el aparato puede tener estos valores determinados previamente de manera que un usuario sólo necesita seleccionar un modo de esterilización predeterminado en el aparato.

Para muchos líquidos, se proporciona una esterilización adecuada destruyendo las paredes celulares de bacterias, hongos y otras células vivas. Este resultado se logra usando frecuencias y longitudes de onda de sonido que excitan preferentemente las membranas de las células al tiempo que calientan mínimamente la disolución hasta que las células se lisan. En la mayoría de los organismos celulares, abrir la membrana y permitir que el contenido se mezcle con un fluido extracelular destruirá el organismo.

Los virus pueden abrirse a la disolución mediante un procesamiento similar. En el caso de virus, la exposición de su ácido nucleico interno a la disolución puede no ser adecuada para inactivarlos completamente, puesto que el ADN o ARN desnudo también puede ser infeccioso. Pueden proporcionarse adyuvantes tales como yodo o enzimas que digieren el ácido nucleico en la disolución para completar la inactivación de los virus.

E. Mezclado, agitación y calentamiento

En muestras de fluido, incluyendo gases y medios granulares y en polvo, el mezclado de la muestra se realiza convencionalmente mediante agitación con vórtex o agitación, u otros métodos tales como inversión de una muestra que contiene un espacio de aire, y agitación por sacudida. La agitación con vórtex se logra esencialmente mediante movimiento mecánico de todo el recipiente mientras que la agitación implica el contacto mecánico de un dispositivo accionado con un fluido. La remoción se logra con una variedad de dispositivos, por ejemplo con hélices, propulsores, paletas y barras de agitación magnéticas. Un problema con estos métodos es que es difícil aumentar su escala con el fin de manipular docenas o cientos de recipientes de muestra de una vez. Otro problema con estos métodos es la dificultad de mezclar múltiples muestras al tiempo que se mantiene cada muestra sustancialmente libre de contaminación. Tal como se describe en más detalle a continuación, los métodos según la invención pueden usar energía sónica para mezclar una muestra al tiempo que se evitan problemas con la contaminación. Pueden usarse factores tales como enfocar la energía sónica, así como controlar de otra forma una forma de onda acústica de la energía sónica, para mezclar selectivamente una muestra, por ejemplo, a través de propagación y/o micropropagación acústica.

Una muestra de fluido puede mezclarse de manera controlable usando los sistemas descritos en el presente documento. No se requiere contacto directo entre el material que va a mezclarse y la fuente de energía sónica. Cuando el material que va a mezclarse está en una cámara de tratamiento, no es necesario que la fuente toque la propia cámara de tratamiento y normalmente está acoplada a la fuente mediante un medio de acoplamiento.

F. Potenciación de reacciones y separaciones

En determinadas realizaciones, la temperatura, el mezclado, o ambos pueden controlarse con energía ultrasónica para potenciar una reacción química. Por ejemplo, la velocidad de asociación entre un ligando presente en una muestra que va a tratarse y una pareja de unión suministrada de manera exógena puede acelerarse. En otro ejemplo, se realiza un ensayo en el que la temperatura se mantiene y el mezclado se aumenta para mejorar la asociación de dos o más moléculas en comparación con las condiciones ambientales. Es posible combinar los diversos aspectos del procedimiento descrito en el presente documento sometiendo en primer lugar una mezcla a calentamiento y mezclado con el fin de separar un ligando o analito en la mezcla de las parejas de unión endógenas en la mezcla. La temperatura, el mezclado, o ambos, se cambian con respecto a la condición inicial para potenciar la formación de complejos de ligando con una pareja de unión suministrada de manera exógena en relación con la formación de complejos de ligando/pareja de unión endógena a temperatura ambiental y mezclado. Generalmente, las segundas condiciones de temperatura y/o mezclado son intermedias entre las condiciones ambientales y las condiciones usadas en la primera etapa de separación anterior. En la segunda condición de temperatura y mezclado, el ligando separado se hace reaccionar con la pareja de unión suministrada de manera exógena.

Ciclado térmico de reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")

Uno de los cuellos de botella de la técnica de PCR es el tiempo de enfriamiento. El ciclo de calentamiento es rápido; sin embargo, el enfriamiento está limitado por la convección. Incluso en formatos de biochip, en los que el ADN u otra molécula diana se inmoviliza en una matriz sobre un microdispositivo, no hay o proceso de enfriamiento "activo". Sin embargo, determinadas realizaciones de la invención pueden usarse para superar este cuello de botella.

En determinadas realizaciones, puede usarse un proceso de tratamiento para tanto calentar como enfriar la muestra rápidamente sin apenas rebasar una temperatura inicial a la que el cebador y la diana que va a amplificarse se aparean. El proceso puede resumirse tal como sigue. Se trata una muestra con energía sónica de potencia relativamente alta de manera que la muestra absorbe la energía sónica y se calienta. Entonces, se mezcla la

muestra a baja potencia para enfriar la muestra forzando la convección, lo que puede lograrse conjuntamente con un baño de agua fría. Las etapas de calentamiento y enfriamiento pueden realizarse en la misma cámara 10, o alternativamente en cámaras 10 separadas, por ejemplo, en un sistema como el de la figura 23. El material puede controlarse mediante el ritmo del mecanismo de transferencia, tal como la bomba, para permitir tiempos de procesamiento diferenciados “en la cámara” antes de descargar el material e introducir nuevo material. Esto puede proporcionar tiempo para desarrollar completamente las etapas de proceso tales como procesamiento, mezclado, enfriamiento y otras antes de introducir nueva muestra sin procesar en la cámara.

G. Control de la purificación, separación y reacción

Pueden usarse campos sónicos enfocados para potenciar las separaciones. Tal como se indica en otra parte, pueden usarse focos sónicos para disminuir o eliminar efectos de pared en flujo de fluido, que es un elemento importante de muchos procesos de separación, tales como cromatografía incluyendo cromatografía de gases, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, y otras formas conocidas, incluyendo fraccionamiento de campo-flujo. La capacidad para modular y/o reducir o eliminar de manera remota los gradientes de velocidad y concentración de una corriente de flujo puede aplicarse en una amplia variedad de situaciones.

También pueden usarse campos sónicos para minimizar la polarización por concentración en procesos de membrana, incluyendo clasificación de partículas, filtración de partículas finas y coloides, ultrafiltración, ósmosis inversa y procesos similares. La polarización de concentración es el resultado de la tendencia del material filtrado a estar presente a alta concentración en una capa sobre el filtro. Esta capa tiene una baja concentración de fluido y, por tanto, disminuye la velocidad de filtración a medida que la disolución filtrada se vuelve más concentrada, o a medida que la capa se engrosa. Esta capa puede agitarse de manera remota mediante energía sónica enfocada de intensidad baja a moderada. La velocidad de flujo, por tanto, puede potenciarse sin coste significativo en energía o vida de la membrana.

H. Usos adicionales para el mezclado de disoluciones controlado y accionado de manera remota con energía sónica

El control de la emisión de energía sónica, las características de la energía sónica y/o la ubicación de una diana en relación con la energía sónica también pueden usarse para bombear y controlar la velocidad de flujo de líquidos, especialmente en capilares; potenciar reacciones químicas, tal como potenciar las velocidades de reacción de segundo orden; aumentar el número de Reynolds eficaz en flujo de fluido; y controlar la dispensación de sustancias semisólidas.

Enfocando la energía sónica y situándola cerca de una pared de una cámara u otra discontinuidad en una trayectoria de fluido, muchas diferencias locales en la distribución de materiales dentro de una muestra y/o barreras de reacción derivadas espacialmente, de manera particular en sistemas reactivos y de flujo, pueden reducirse hasta los retrasos mínimos requeridos para la difusión microscópica. Dicho de otra forma, puede obtenerse un mezclado potenciado en situaciones en las que es común un mezclado imperfecto.

El controlador 20 puede incluir cualquier componente adecuado para realizar el control, la comunicación y/u otras funciones deseadas tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, el controlador 20 puede incluir uno o más ordenadores de propósito general, una red de ordenadores, uno o más microprocesadores, etc., para realizar funciones de procesamiento de datos, una o más memorias para almacenar datos y/o instrucciones de funcionamiento (por ejemplo, incluyendo memorias volátiles y/o no volátiles tales como discos ópticos y unidades de disco, memorias de semiconductor, memorias de disco o cinta magnética, y así sucesivamente), vías de comunicación u otros dispositivos de comunicación para comunicación alámbrica o inalámbrica (por ejemplo, incluyendo diversos cables, conmutadores, conectores, dispositivos de comunicación por Ethernet, dispositivos de comunicación por WLAN, y así sucesivamente), software u otras instrucciones ejecutables por un ordenador (por ejemplo, incluyendo instrucciones para llevar a cabo funciones relacionadas con el control de la fuente de energía acústica 2, una bomba 33, etc., tal como se describió anteriormente y otros componentes), un suministro de potencia u otra fuente de potencia (tal como un enchufe para su acoplamiento con una salida eléctrica, baterías, transformadores, etc.), relés y/u otros dispositivos de conmutación, uniones mecánicas, uno o más sensores o dispositivos de introducción de datos (tales como un sensor para detectar una temperatura y/o la presencia del material en una cámara 10, una cámara de vídeo u otro dispositivo de obtención de imágenes para capturar y analizar la información de imágenes con respecto a la cámara 10 u otros componentes, sensores de posición para indicar las posiciones del transductor acústico 2 y/o el recipiente 10, y así sucesivamente), dispositivos de introducción de datos por el usuario (tales como botones, diales, pulsadores, un teclado, una pantalla táctil u otro), dispositivos de presentación visual de la información (tales como una pantalla de visualización de LCD, luces indicadoras, una impresora, etc.), y/u otros componentes para proporcionar las funciones de control y entrada/salida deseadas.

Ha de entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. Otras realizaciones y maneras de llevar a cabo la invención son posibles. La fraseología y terminología usadas en el presente documento son para el fin de descripción y no deben considerarse como limitativos. El uso de “que incluye”, “que comprende” o “que tiene”

- 5 y variaciones de los mismos pretende abarcar los artículos enumerados después de eso y equivalentes de los mismos así como artículos adicionales. Habiendo por tanto descrito diversas realizaciones ilustrativas y aspectos de las mismas, pueden resultar evidentes modificaciones y alteraciones para los expertos en la técnica. Tales modificaciones y alteraciones pretenden estar incluidas en esta divulgación, que es para el fin de ilustración sólo, y no pretende ser limitativa. El alcance de la invención debe determinarse a partir de la construcción apropiada de las reivindicaciones adjuntas, y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una composición nanocristalina, que comprende:
5 proporcionar al menos una porción de una muestra que comprende un volumen mayor de 30 ml en un recipiente;
10 transmitir energía acústica enfocada mayor de 1000 ciclos por estallido que tiene una frecuencia de entre aproximadamente 100 kilohercios y aproximadamente 100 megahercios y una zona focal que tiene una dimensión de tamaño de menos de aproximadamente 2 centímetros a través de una pared del recipiente de manera que la al menos una porción de la muestra se dispone en la zona focal; y
15 formar, a través del crecimiento cristalino, una pluralidad de partículas cristalinas en la muestra que tienen un tamaño promedio mayor de aproximadamente 10 nm y un índice de polidispersidad de menos de 1,0 tal como se calcula según la norma internacional sobre dispersión de luz dinámica ISO 13321, mediante, al menos en parte, la exposición de la muestra a la zona focal.
2. Método según la reivindicación 1, en el que transmitir energía acústica enfocada de manera que la muestra se disponga al menos parcialmente en la zona focal comprende transmitir la energía acústica enfocada a
20 entre 1000 ciclos por estallido y 6000 ciclos por estallido, o mayor de 6000 ciclos por estallido.
3. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se expone a la zona focal durante menos de 1 hora.
- 25 4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de partículas cristalinas en la muestra tienen un tamaño promedio de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1 micrómetro.
5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el índice de polidispersidad de la pluralidad de partículas cristalinas en la muestra, tal como se calcula según la norma internacional sobre dispersión de luz dinámica ISO 13321, es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,1, o tiene una desviación
30 estándar relativa de menos del 1% de un tamaño de partícula promedio de la pluralidad de partículas cristalinas.
- 35 6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además provocar el flujo de una porción de la muestra a través de al menos una cámara de proceso del recipiente de manera que la muestra se expone a la zona focal mientras está dispuesta en la al menos una cámara de proceso.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la al menos una cámara de proceso incluye una entrada y una salida dispuestas de manera que la muestra se expone a la zona focal mientras está dispuesta en la al
40 menos una cámara de proceso.
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que provocar el flujo de una porción de la muestra a través de la al menos una cámara de proceso comprende provocar el flujo de la muestra a través de la entrada y la salida de la al menos una cámara de proceso y exponer la muestra a la zona focal múltiples
45 veces.
9. Método según una de las reivindicaciones 6 u 8, en el que provocar el flujo de una porción de la muestra en el recipiente comprende provocar el flujo de la porción de la muestra a través del recipiente a una velocidad de al menos 0,1 ml/min, o de entre aproximadamente 0,5 ml/min y aproximadamente 100 ml/min.
50
10. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra incluye un agente bioactivo.
11. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que transmitir energía acústica enfocada de manera que la muestra se disponga al menos parcialmente en la zona focal comprende transmitir la energía
55 acústica enfocada a una potencia de entre 50 vatios y 300 vatios.
12. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además mantener una temperatura de la muestra dentro de un intervalo predeterminado durante el tratamiento con energía acústica.
- 60 13. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además hacer circular un medio de transferencia térmica alrededor de una pared del recipiente en un volumen definido por una camisa que rodea al menos una porción del recipiente.
- 65 14. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que transmitir energía acústica enfocada a través de la pared del recipiente comprende transmitir la energía acústica desde una fuente de energía acústica al recipiente a través de un medio de acoplamiento y controlar la temperatura del medio de

acoplamiento.

- 5
15. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además recircular el medio de acoplamiento hasta y desde el recipiente y a través de un enfriador o calentador adaptado para ajustar una temperatura del medio de acoplamiento.
- 10
16. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además someter la muestra a presurización de manera que una presión dentro del recipiente es mayor que una presión fuera del recipiente.
17. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que transmitir energía acústica enfocada incluye un ciclo de trabajo del 50%.

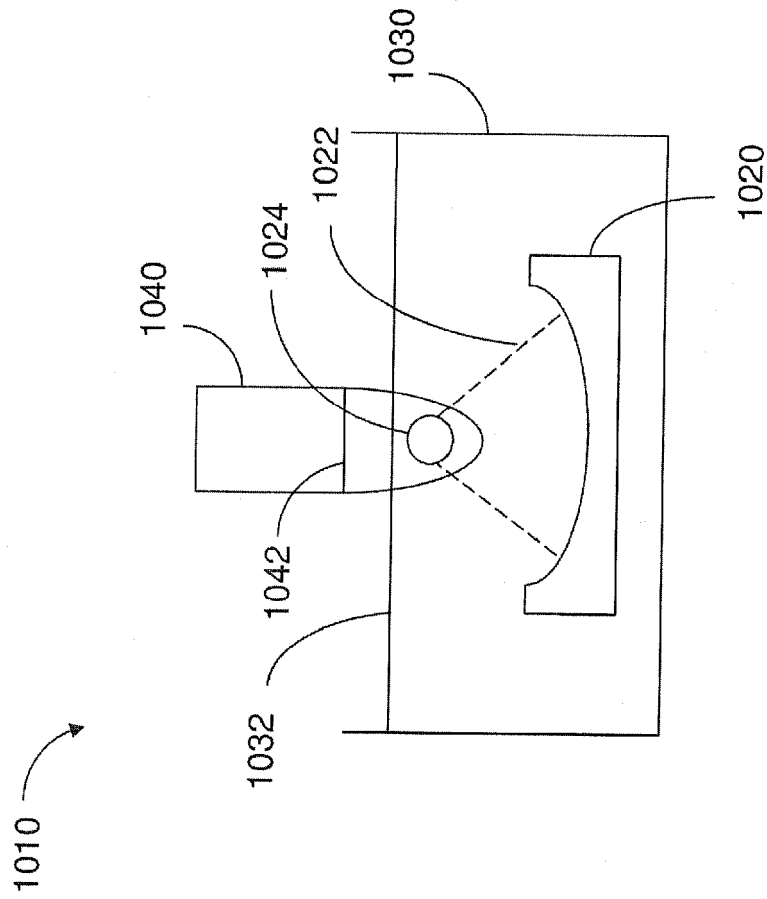


Fig. 1

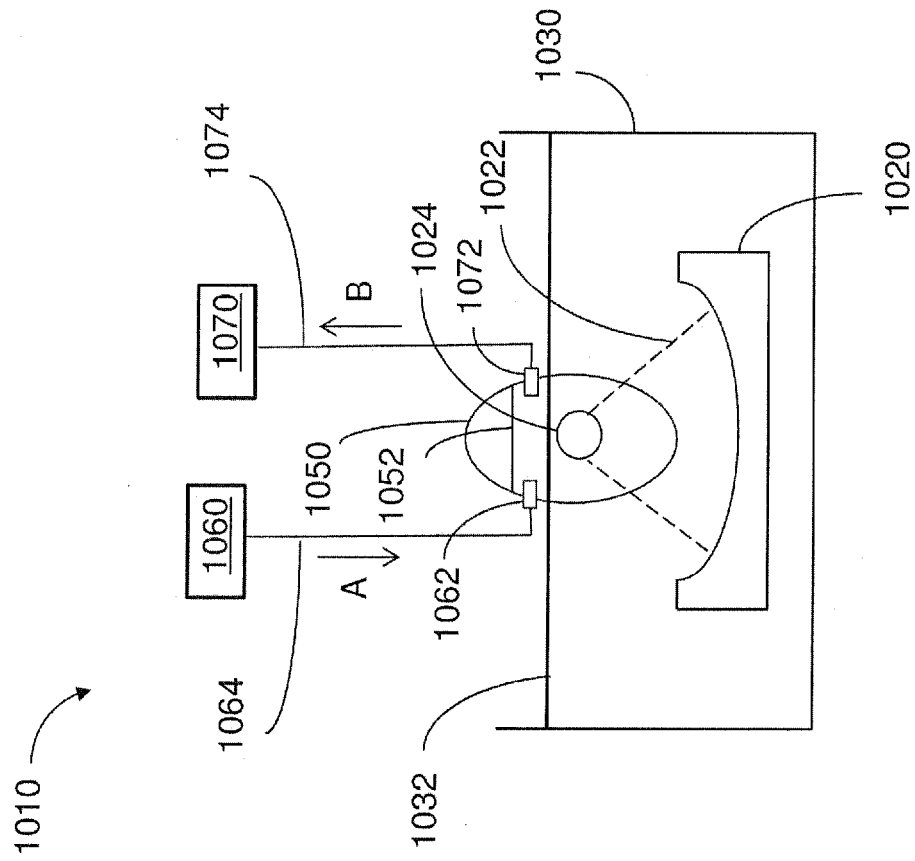


Fig. 2

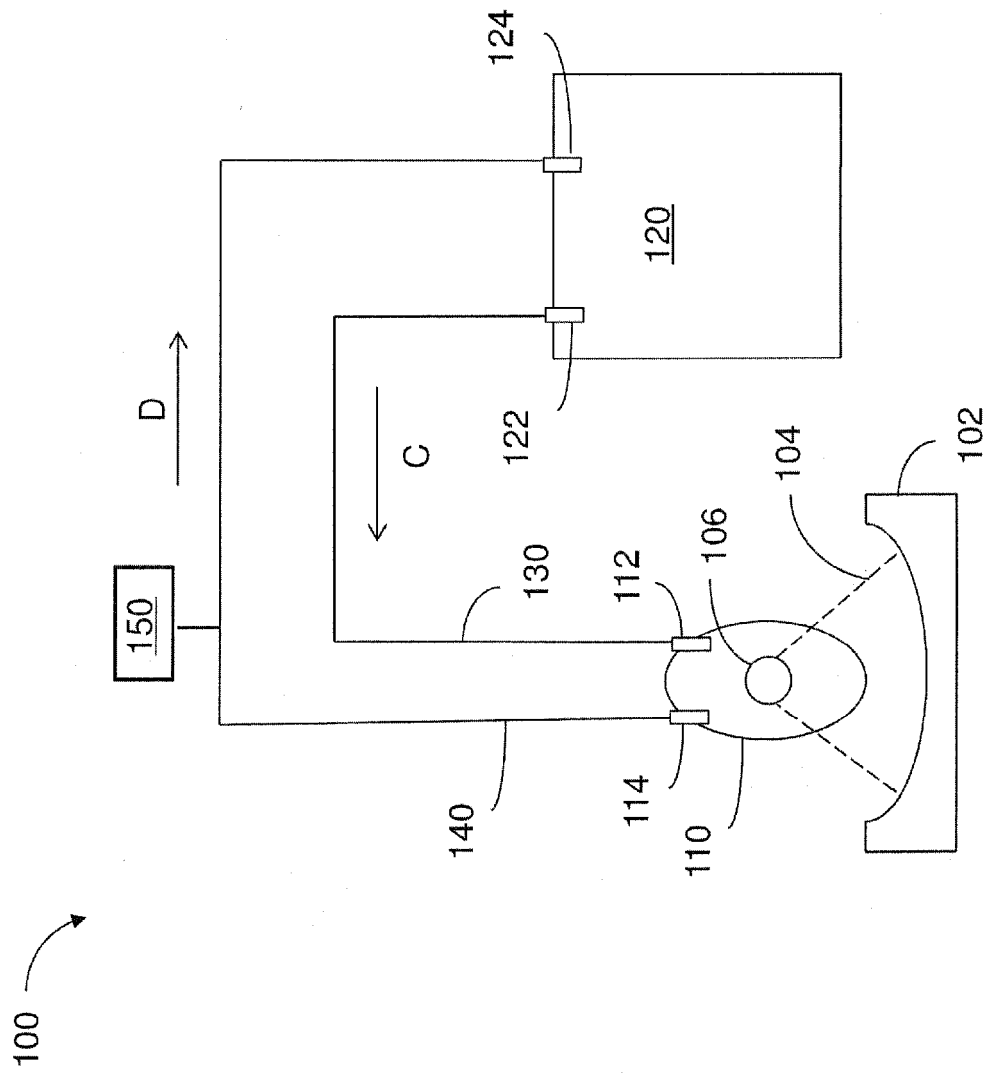


Fig. 3

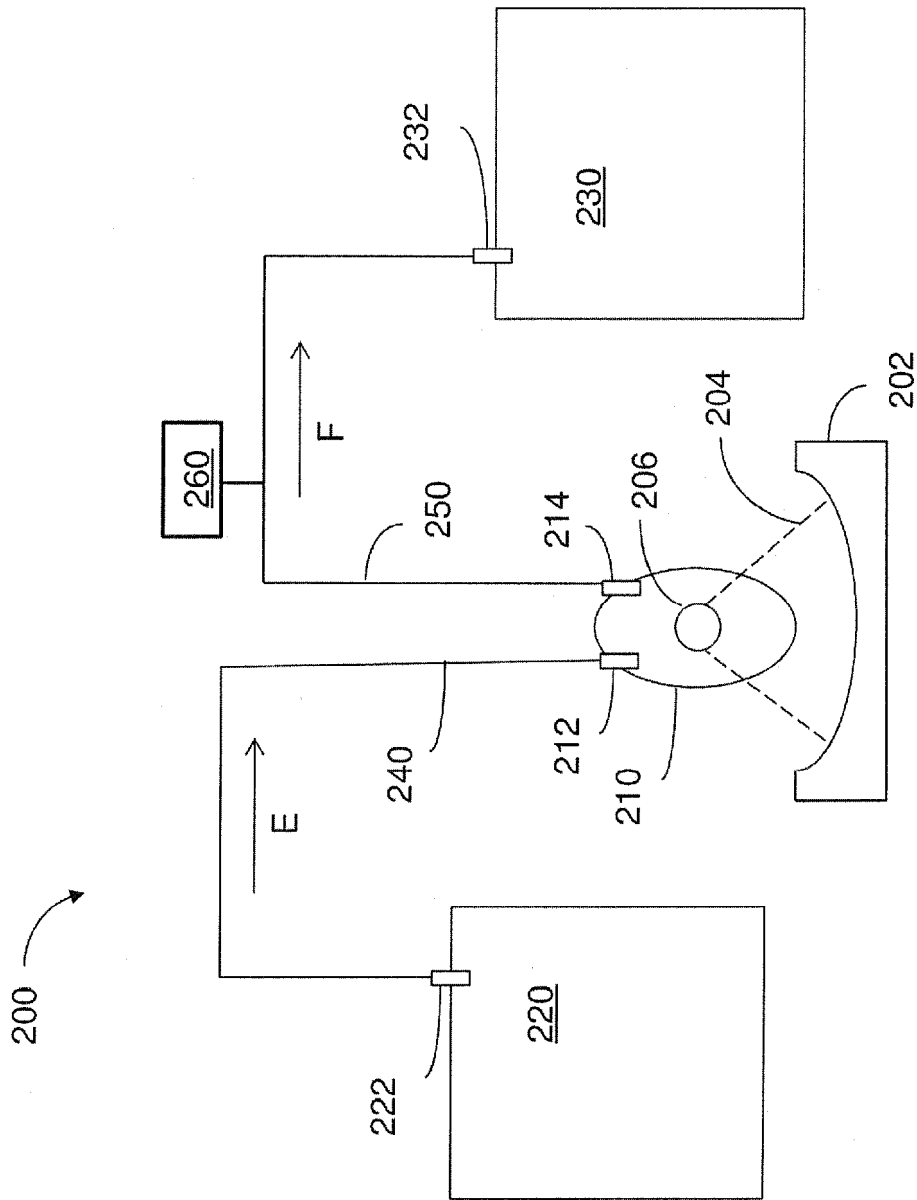


Fig. 4

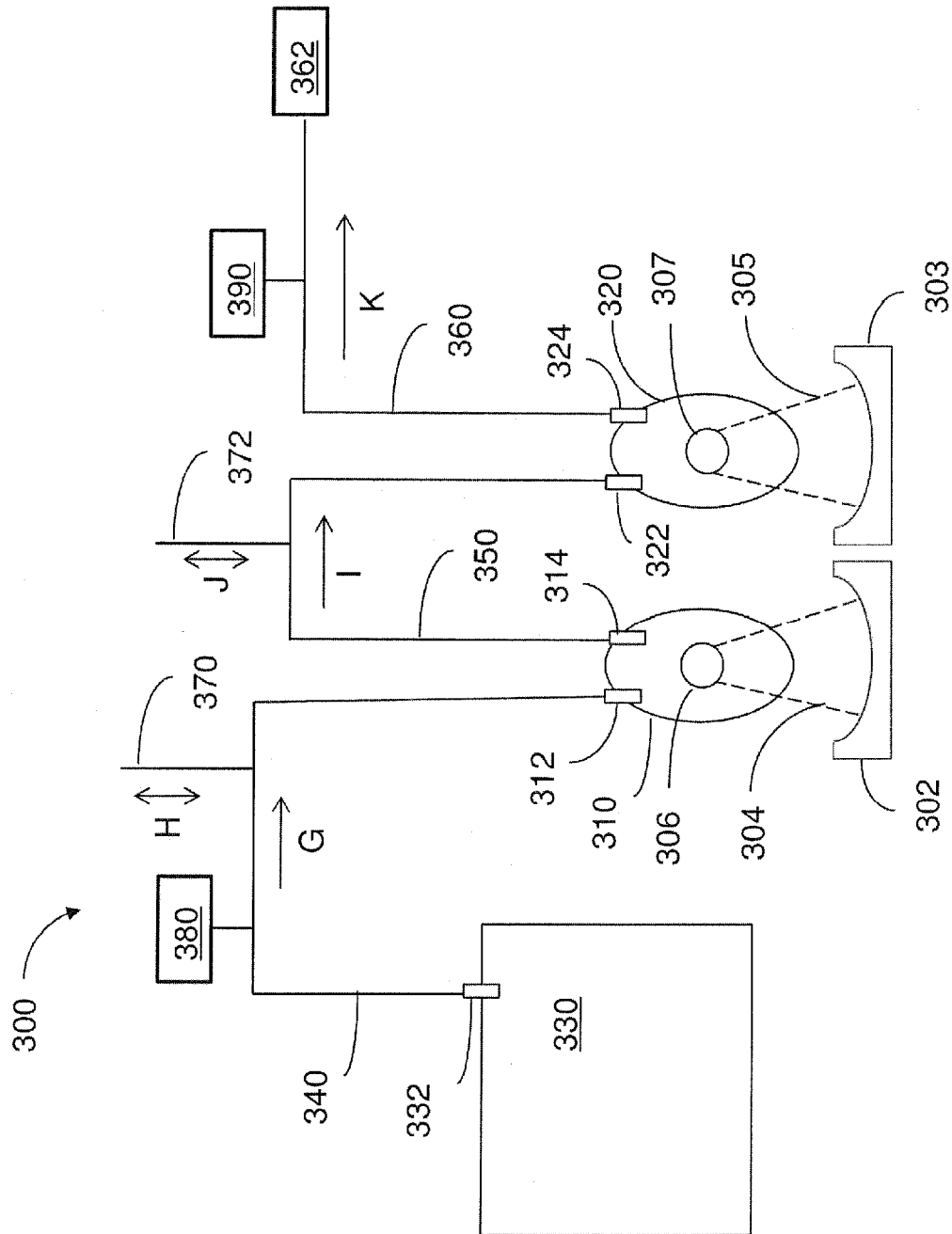


Fig. 5

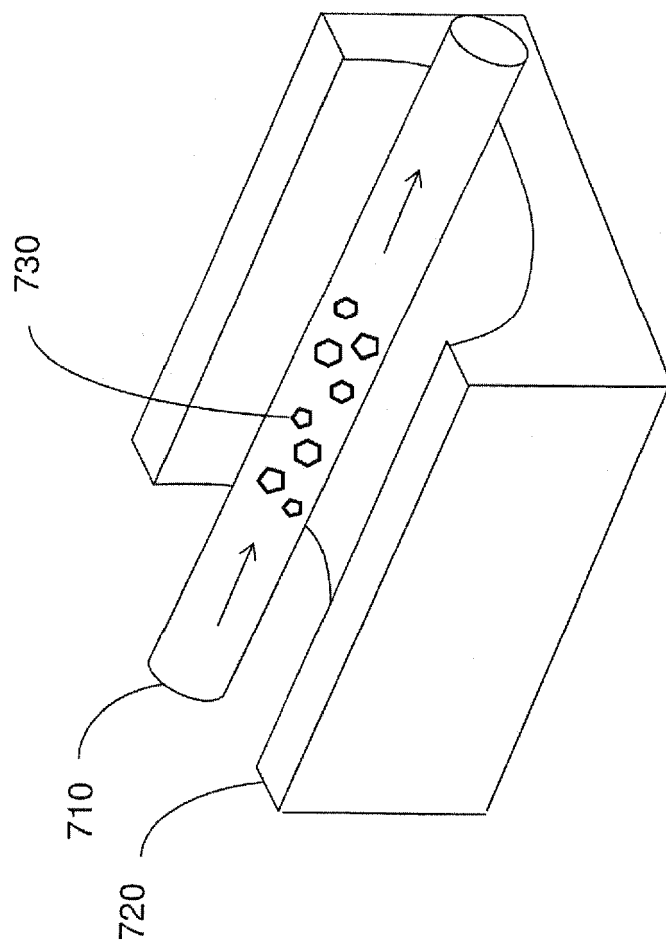


Fig. 6

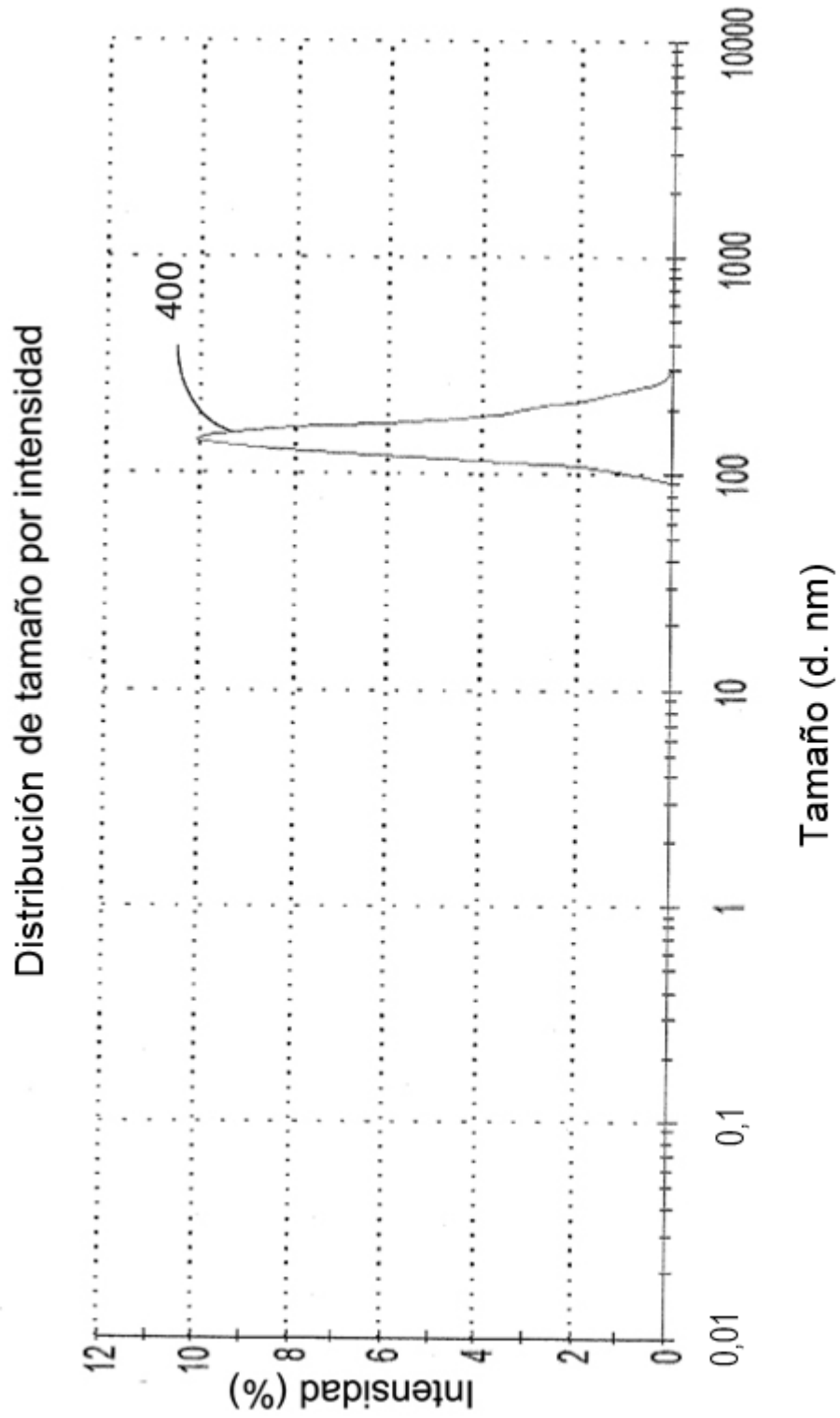


Fig. 7

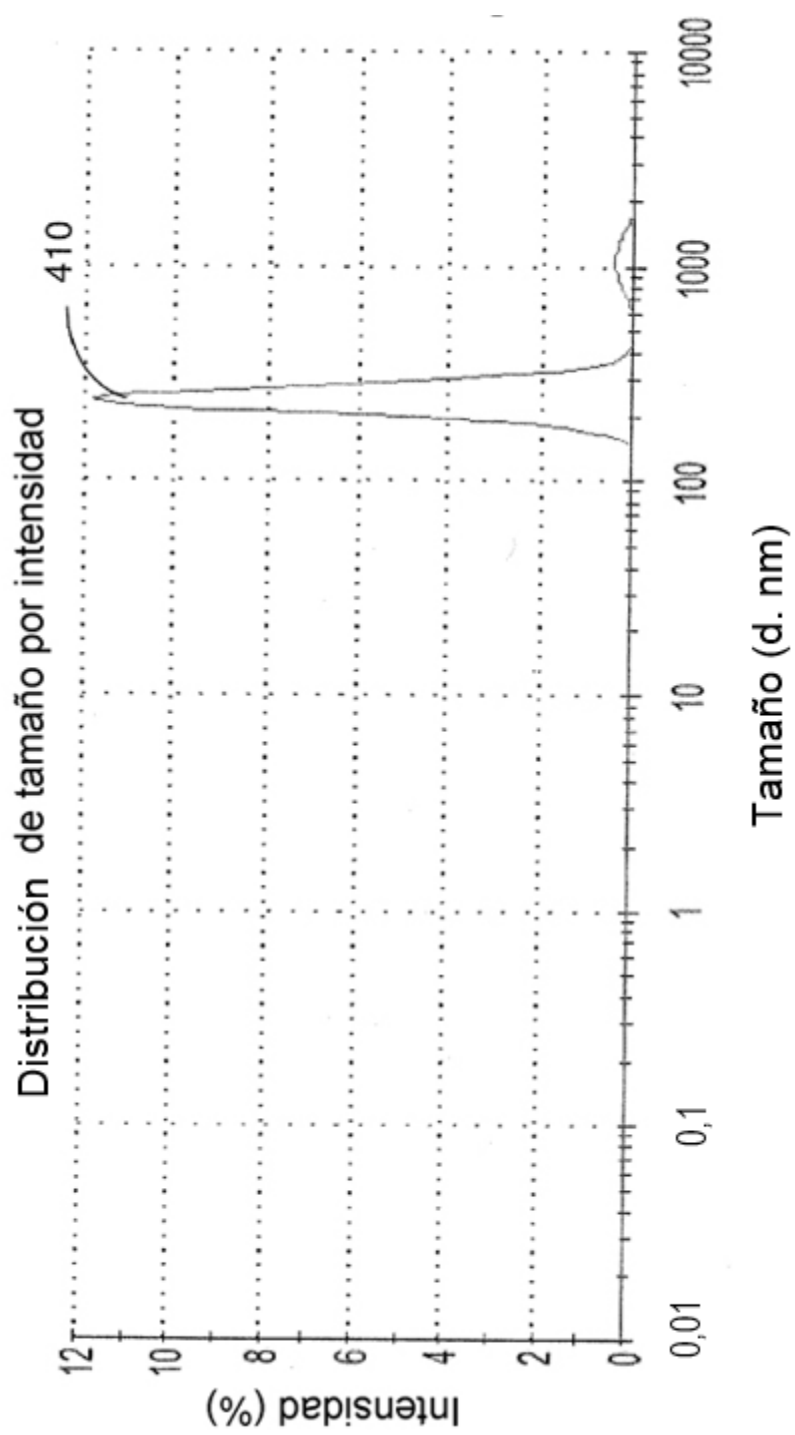
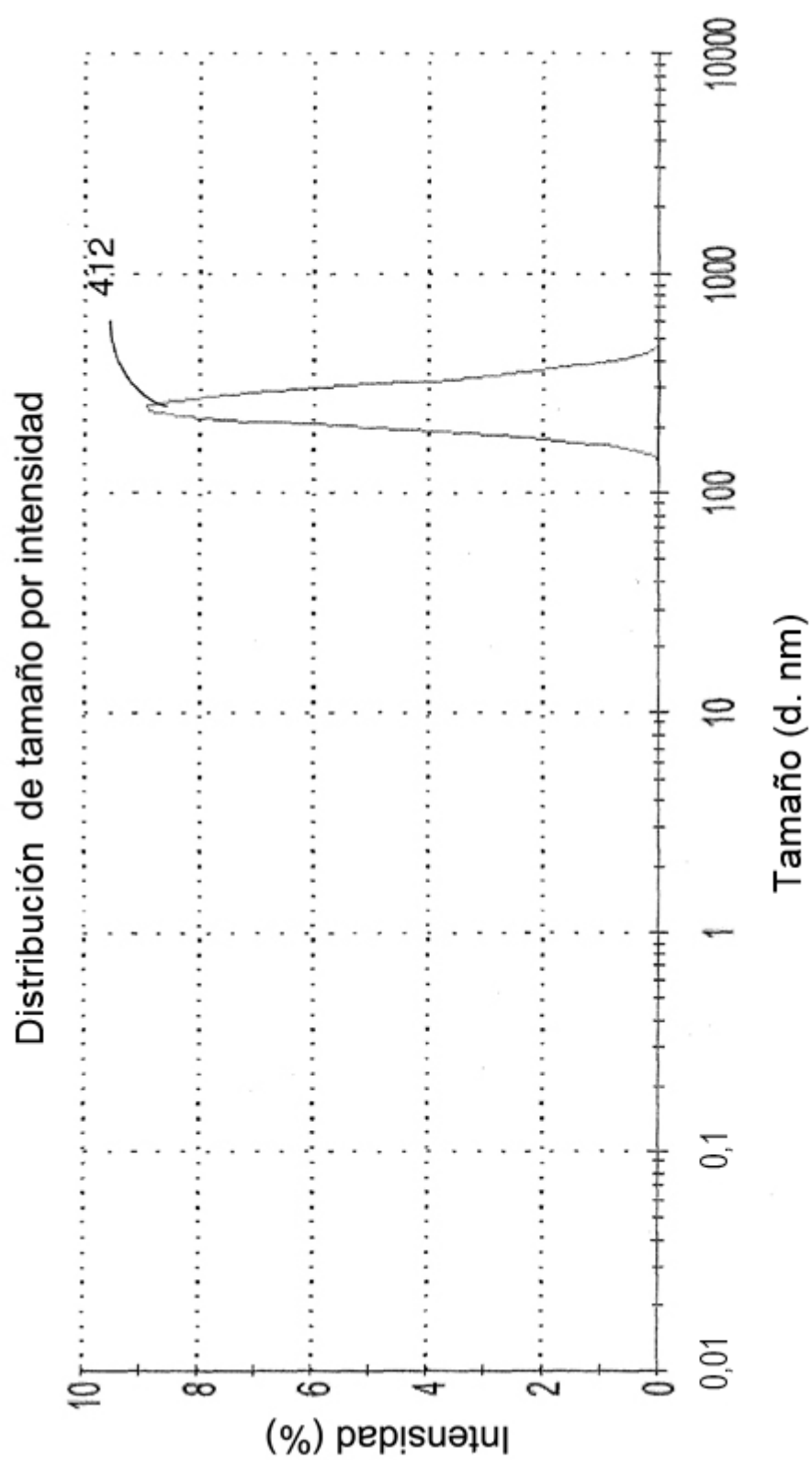


Fig. 8

**Fig. 9**

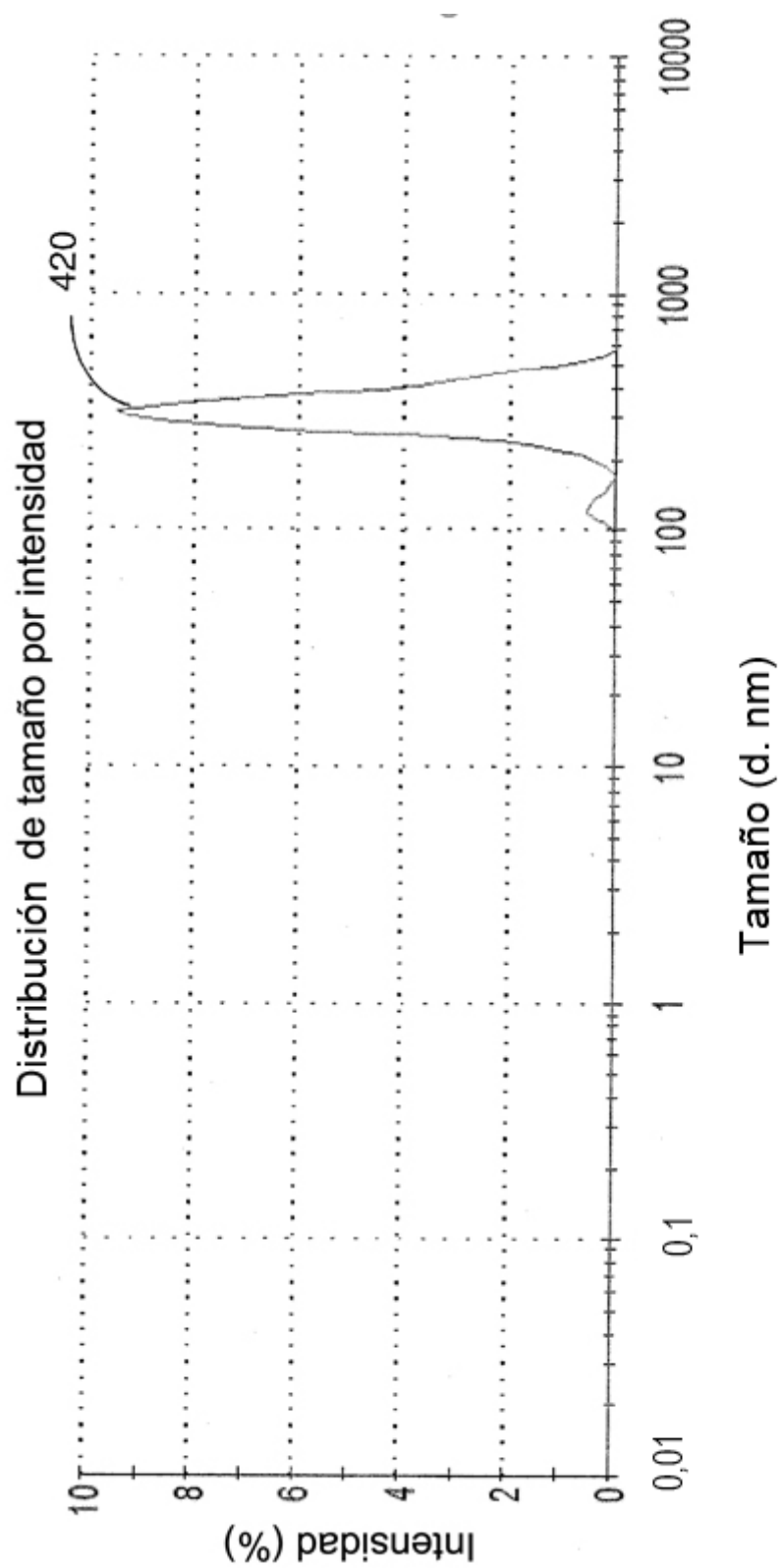
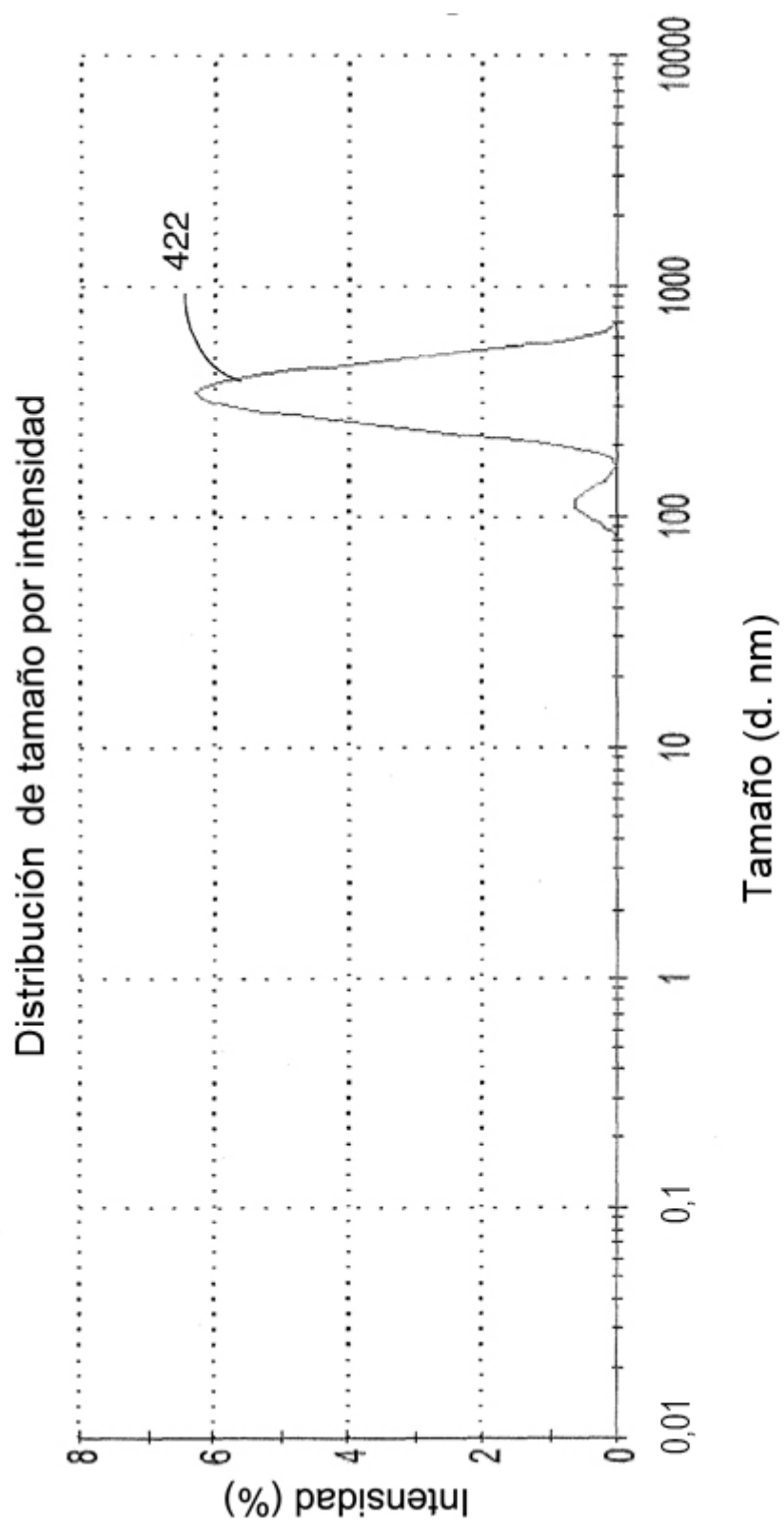


Fig. 10

**Fig. 11**

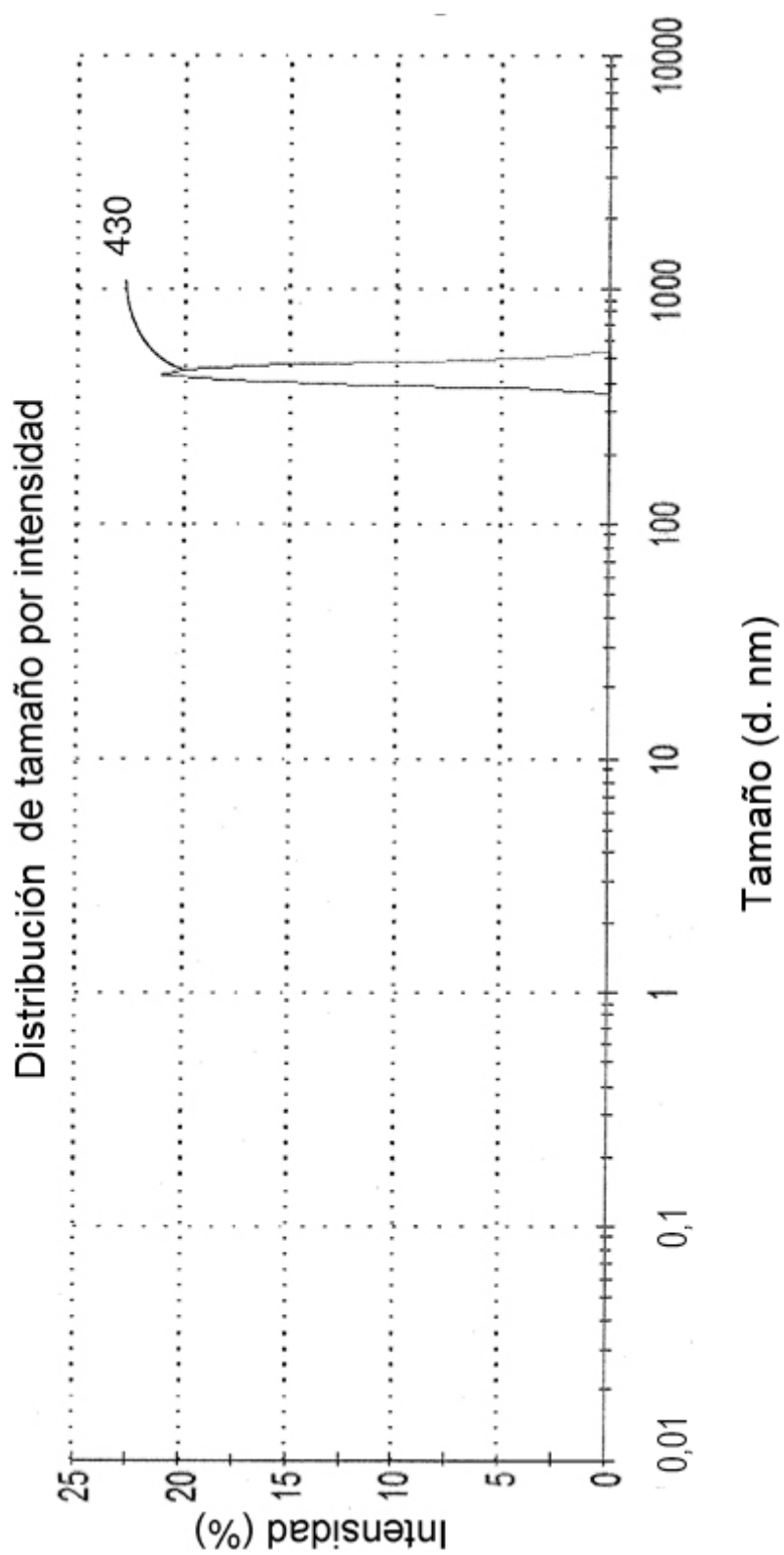


Fig. 12

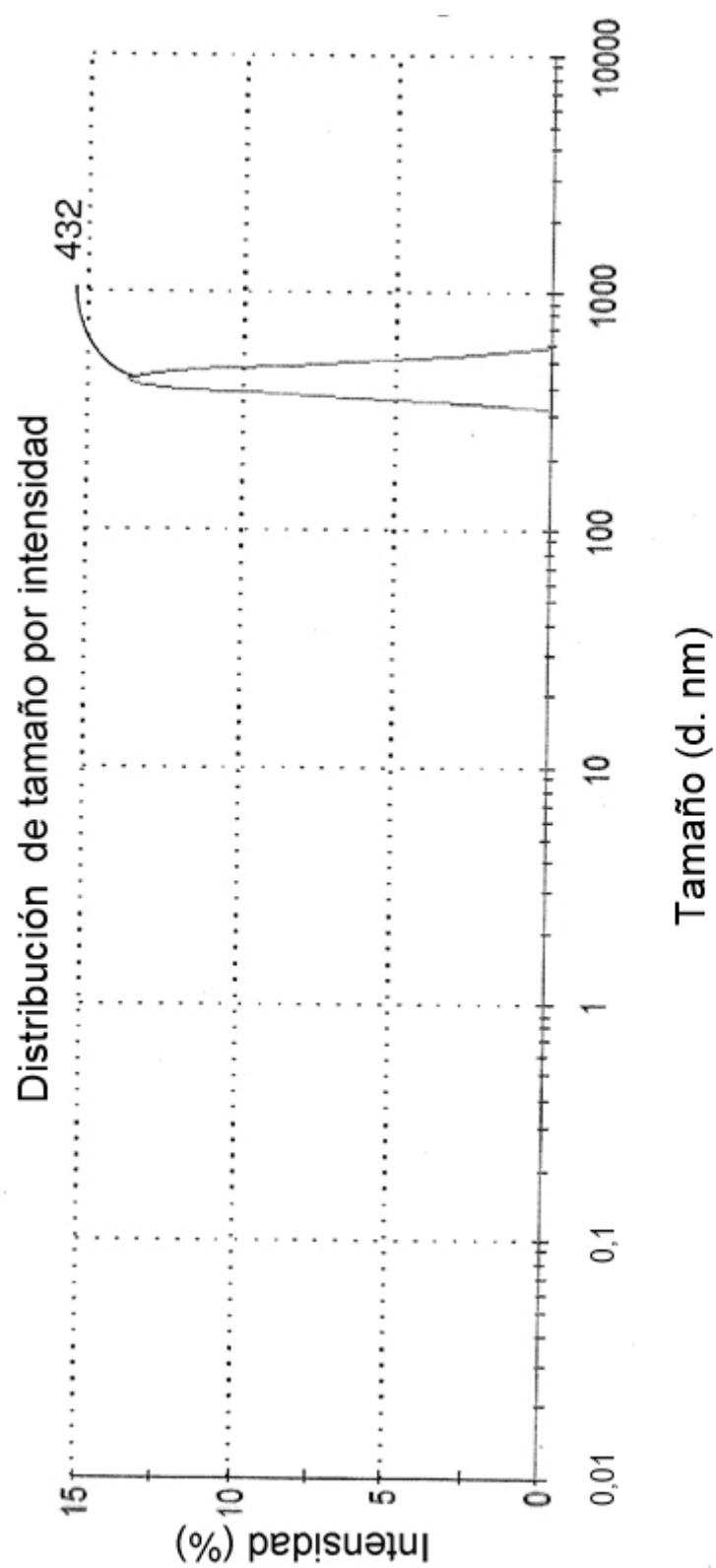
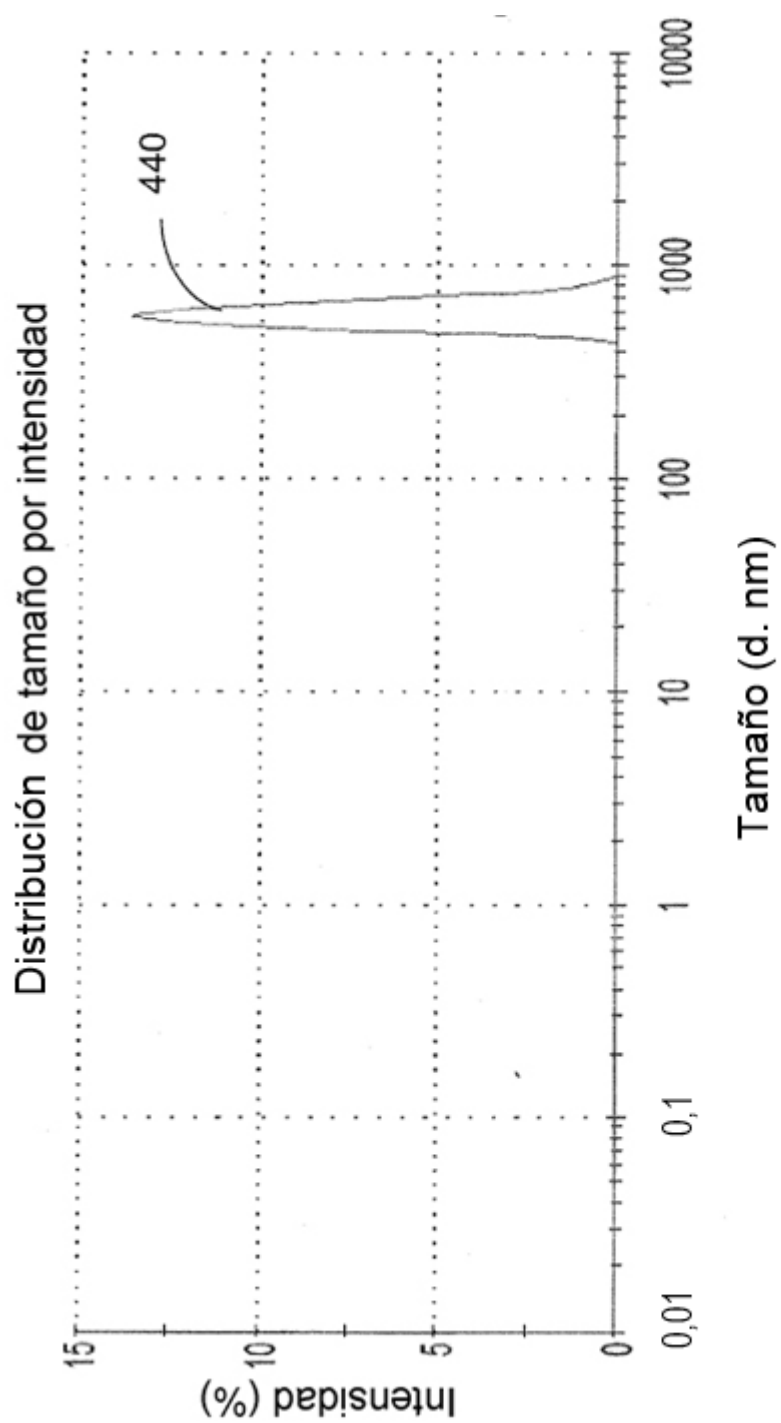


Fig. 13

**Fig. 14**

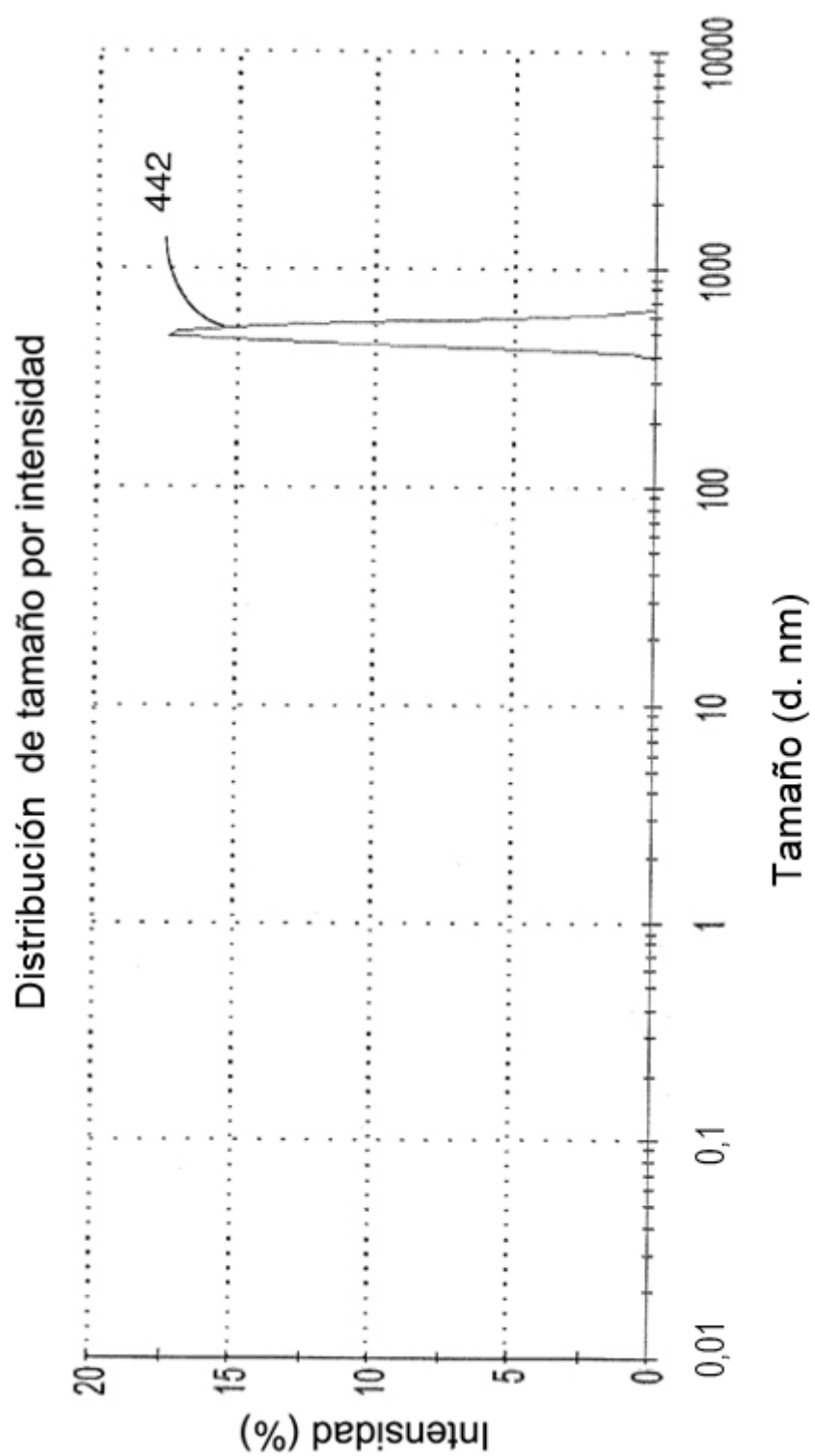


Fig. 15

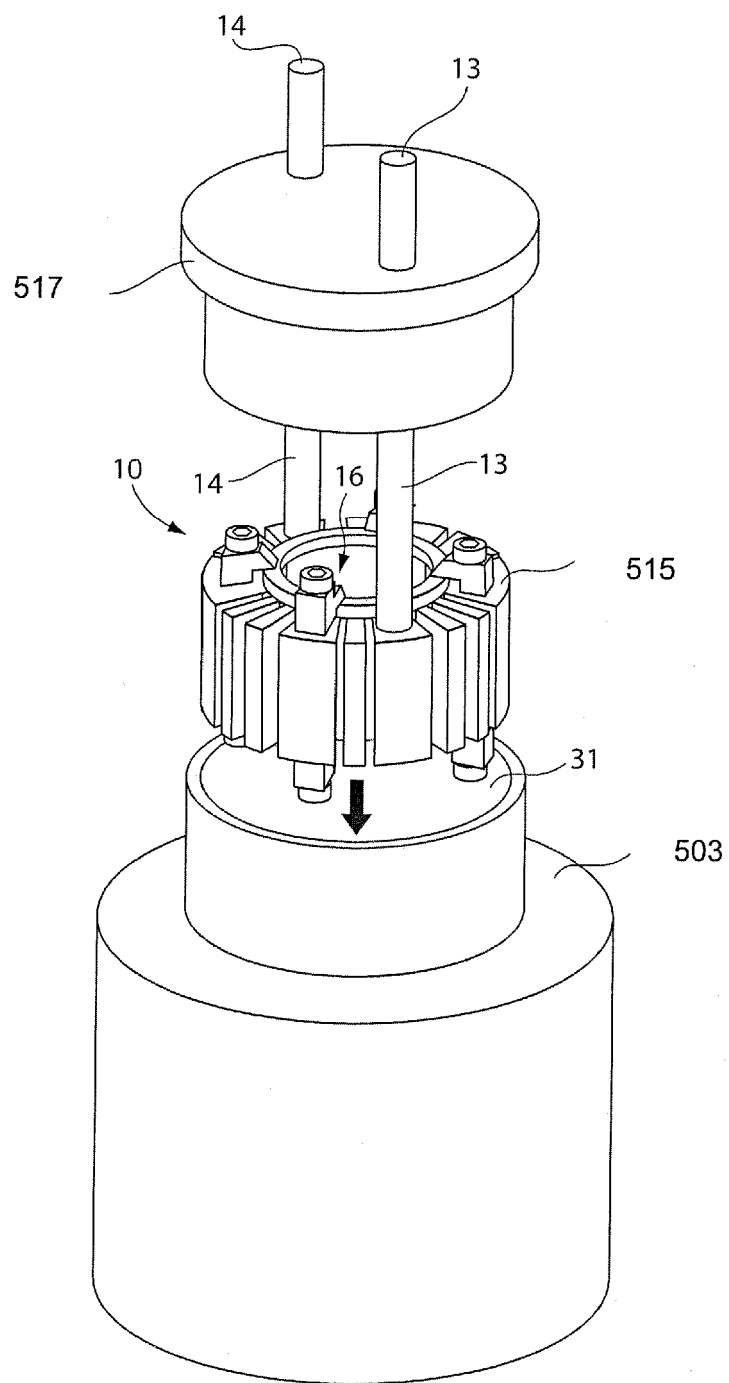


Fig. 16

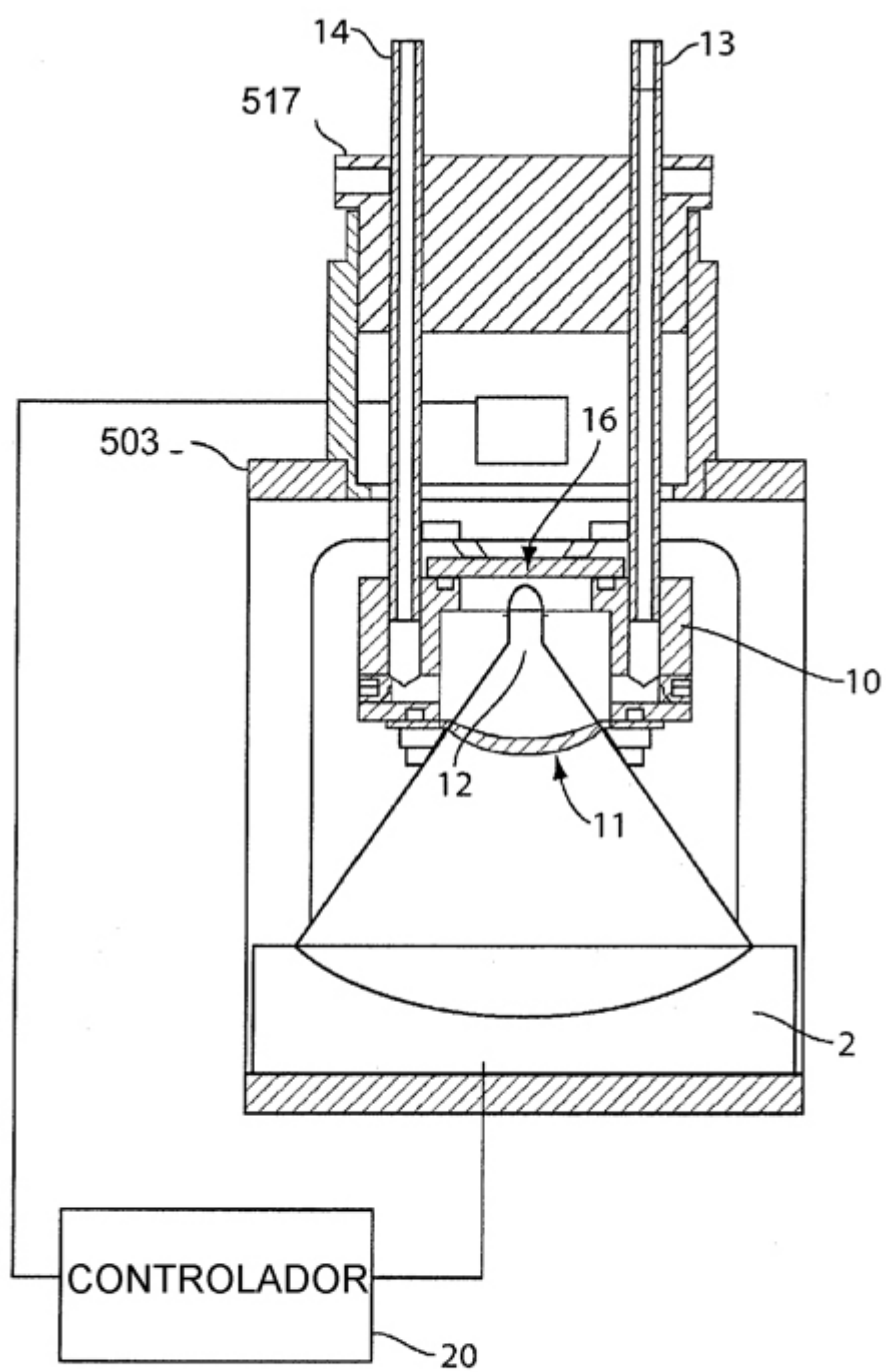


Fig. 17

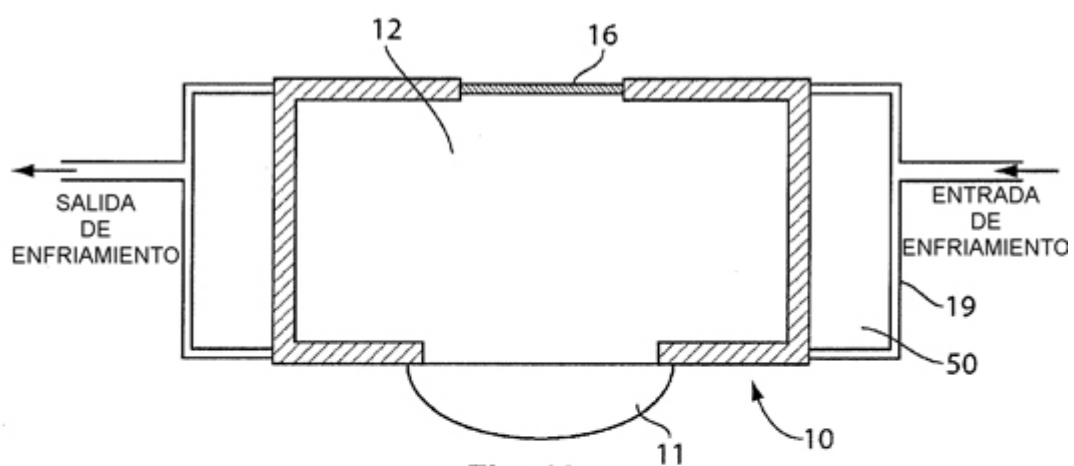


Fig. 18

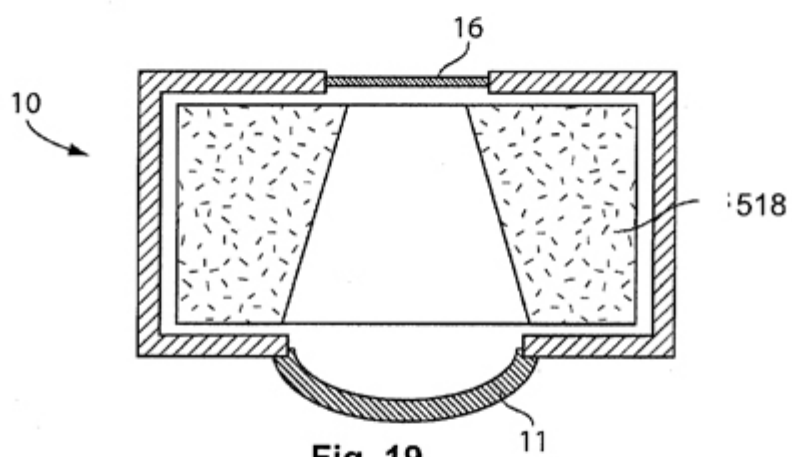


Fig. 19

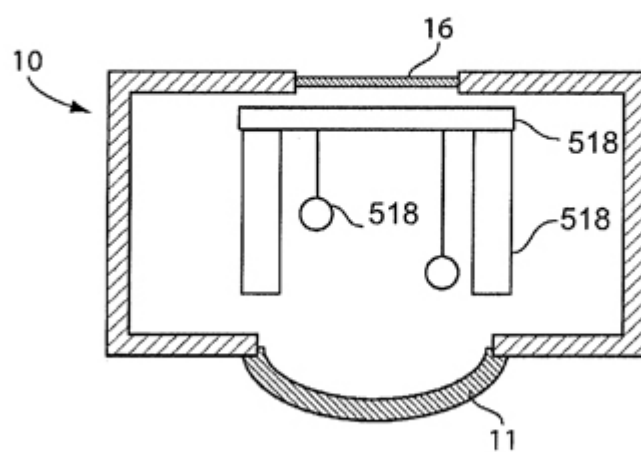


Fig. 20

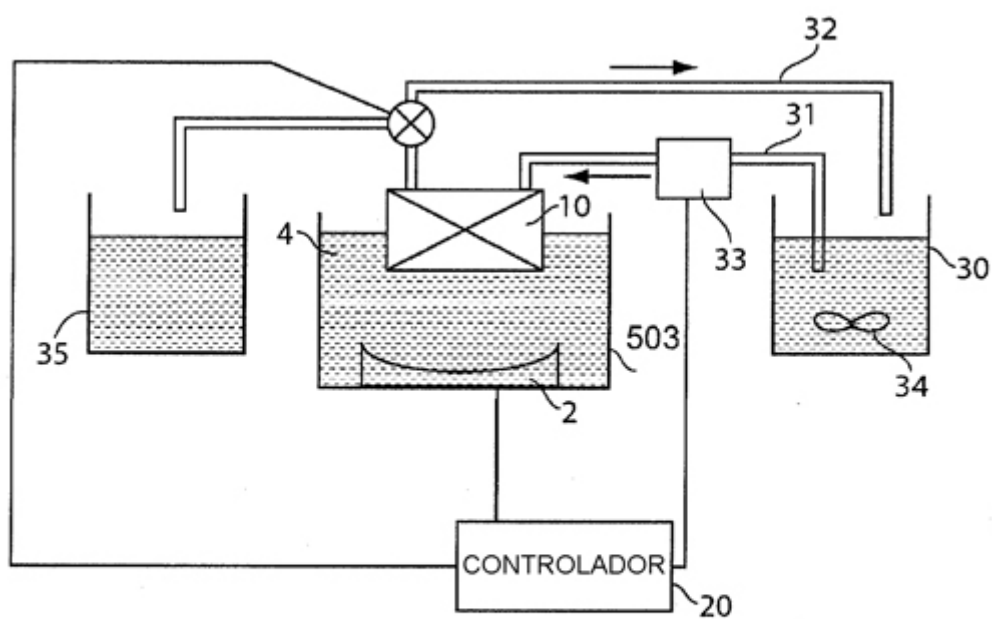


Fig. 21

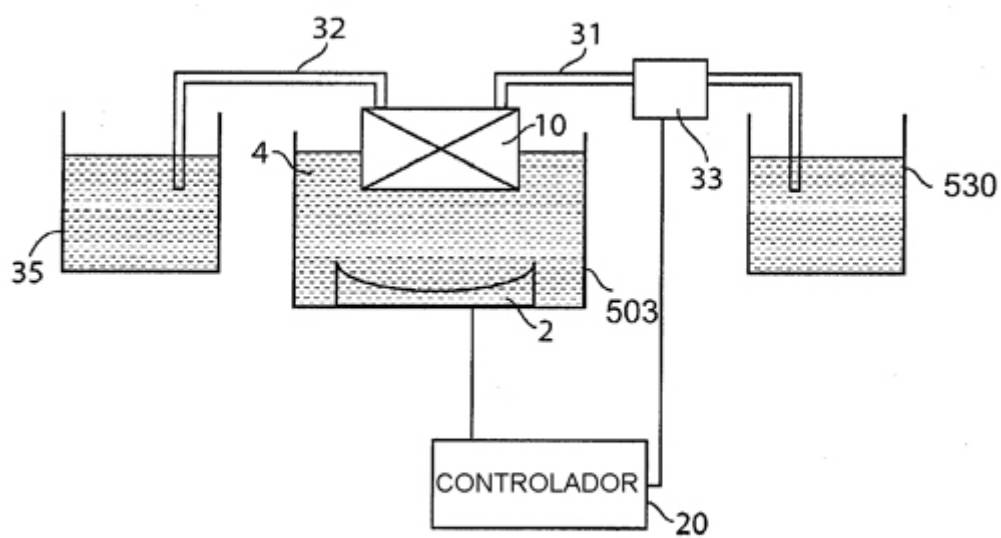


Fig. 22

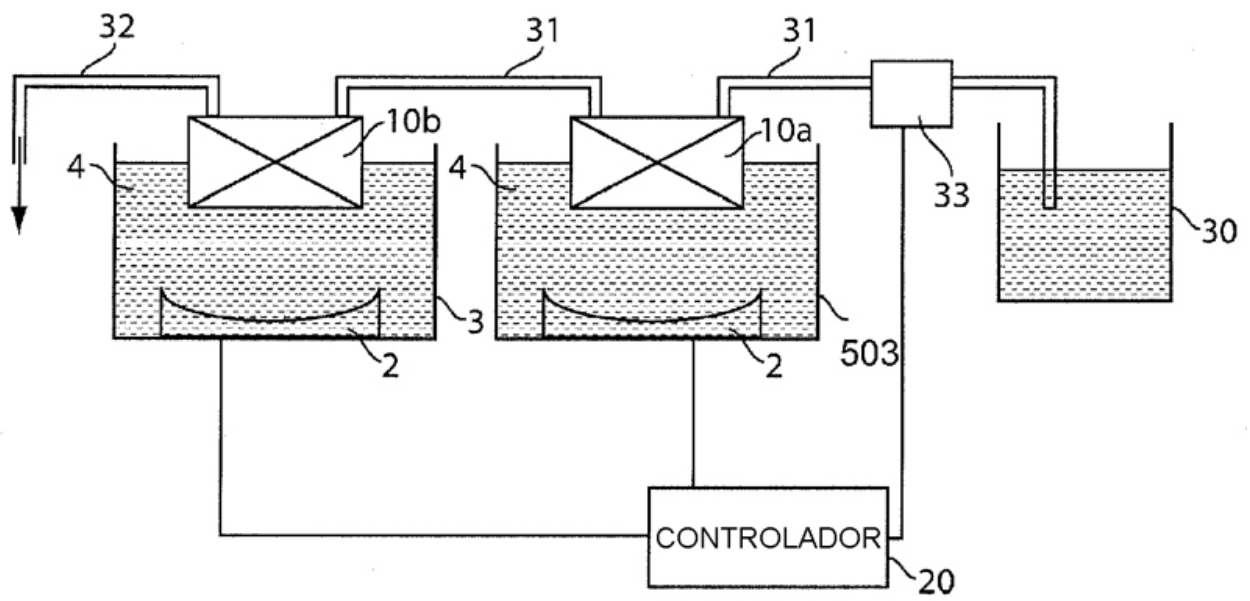


Fig. 23

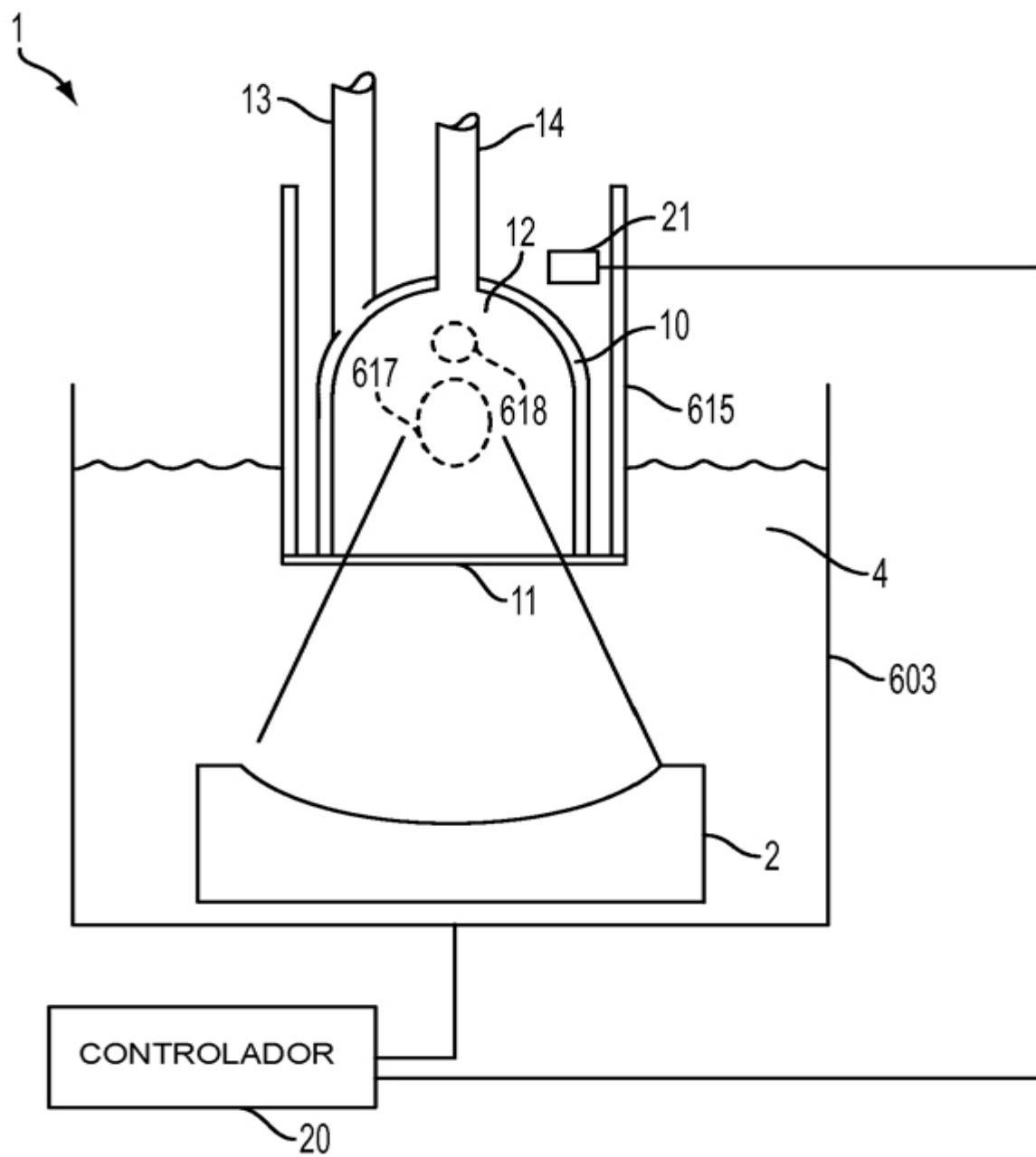


FIG. 24

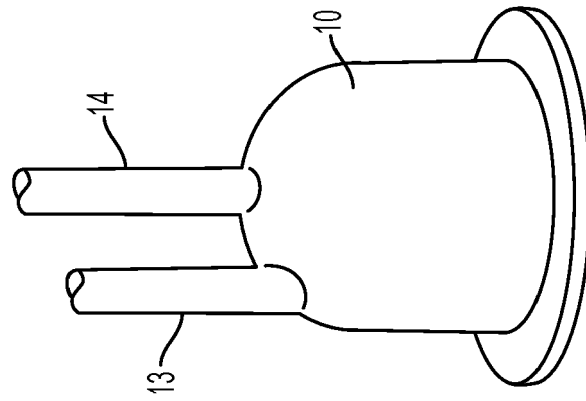


FIG. 26

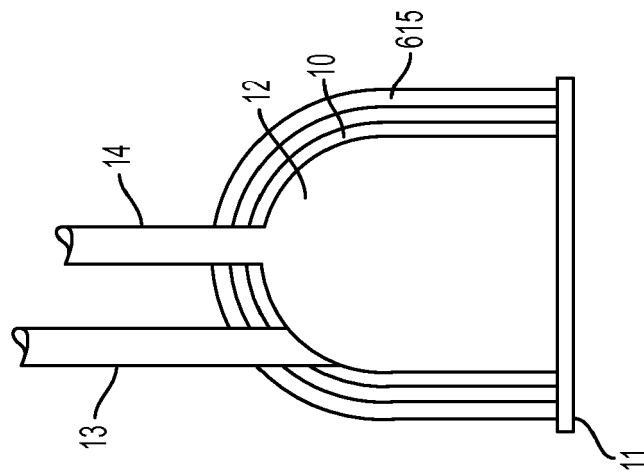


FIG. 25

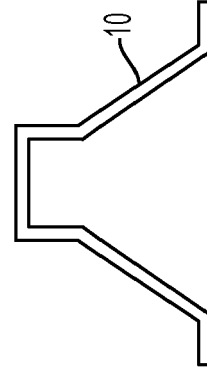


FIG. 27



FIG. 28

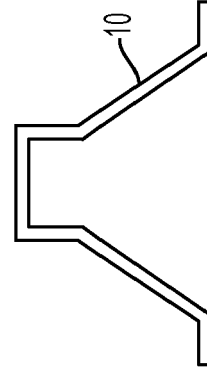


FIG. 29