

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 603**

51 Int. Cl.:

<b>B01D 9/02</b>	(2006.01)
<b>B01D 9/00</b>	(2006.01)
<b>C30B 7/00</b>	(2006.01)
<b>C30B 29/16</b>	(2006.01)
<b>C30B 29/54</b>	(2006.01)
<b>C07C 67/52</b>	(2006.01)
<b>C07C 69/157</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/US2014/025089**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14151146**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14768350 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2969093**

54 Título: **Nucleación y crecimiento cristalino dirigidos a partir de una solución usando materiales amorfos de energía superficial modificada**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361794821 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2020**

73 Titular/es:

**DENOVX, LLC (100.0%)  
651 S. Sutton Road, Suite 300  
Streamwood, IL 60107, US**

72 Inventor/es:

**BOND, ANDREW, H. y  
SCHAAB, KEVIN, M.**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 749 603 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

Nucleación y crecimiento cristalino dirigidos a partir de una solución usando materiales amorfos de energía superficial modificada

5

### Campo de la invención

En el presente documento se describen dispositivos, composiciones, y procedimientos para la producción de materiales cristalinos a partir de una solución. Los dispositivos, composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento dirigen la nucleación y el crecimiento cristalino a partir de una solución usando materiales amorfos de energía superficial modificada.

10

### Antecedentes de la invención

Tres publicaciones científicas y dos documentos de solicitud de patente internacional discuten la cristalización a partir de una solución utilizando técnicas establecidas. Trout *et al.* (Trout, B. L.; Doyle, P. S.; Hatton, T. A.; Myerson, A. S.; Diao, Y.; Helgeson, M. E. Documento de solicitud de patente internacional WO 2012/027398 A2, 2012) describen un procedimiento para facilitar la cristalización utilizando polímeros de gel que tienen poros o características superficiales distribuidos al azar que se hinchan durante el contacto con soluciones que contienen solutos tales como aspirina. Lee *et al.* (Lee, A. Y.; Lee, I. S.; Dette, S. S.; Boerner, J.; Myerson, A. S. Crystallization on Confined Engineered Surfaces: A Method to Control Crystal Size and Generate Different Polymorphs. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127(43), 14982) describen el uso de monocapas autoensambladas en islas de oro metálico cuadradas para la cristalización epitaxial de compuestos orgánicos moleculares tales como glicina. Diao *et al.* (Diao, Y.; Myerson, A. S.; Hatton, T. A.; Trout, B. L. Surface Design for Controlled Crystallization: The Role of Surface Chemistry and Nanoscale Pores in Heterogeneous Nucleation. Langmuir 2011, 27(9), 5324) describen un estudio del papel de los poros distribuidos al azar de diferentes tamaños en sustratos poliméricos en la cristalización de ingredientes farmacéuticos activos tales como aspirina. Cheong *et al.* (Cheong, W. C.; Gaskell, P. H.; Neville, A. Substrate Effect on Surface Adhesion/Crystallisation of Calcium Carbonate. J. Crystal Growth 2013, 363, 7) se centran en reducir la aparición del complejo fenómeno de acumulación de escamas de carbonato de calcio para altas proporciones de sobresaturación. Einav (Einav, M. Documento de solicitud de patente internacional WO 2001/090449 A1, 2001) describe un enfoque epitaxial para el crecimiento de cristales en un sustrato para aplicaciones electrónicas.

15

20

25

30

35

40

45

La fase sólida puede existir en una diversidad de formas que van desde materiales amorfos sin un orden de largo alcance hasta sólidos cristalinos que exhiben un alto grado de orden de largo alcance con una distribución espacial interatómica consistente en todo el cristal. Los átomos, iones o moléculas en un cristal ocupan consistentemente ubicaciones relacionadas con la simetría a través de una red cristalina para dar una fase sólida altamente pura que se puede obtener de manera consistente, conveniente y rentable.

El procedimiento de cristalización está dirigido termodinámicamente y controlado cinéticamente, y estas observaciones tienen implicaciones importantes. El procedimiento de cristalización se separa en dos procedimientos por etapas, a saber, la génesis de los cristales, también conocida como nucleación, que va seguida por el crecimiento de los cristales. En el presente documento se describen procedimientos para dirigir la nucleación y el crecimiento de cristales usando modificaciones de energía superficial en sustratos amorfos.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para iniciar la nucleación primaria heterogénea de cristales de un soluto a partir de una solución del soluto, de acuerdo con las reivindicaciones. La presente invención se refiere además a un kit que comprende una pluralidad de sustratos para iniciar la nucleación primaria heterogénea de cristales de un soluto a partir de una solución, de acuerdo con las reivindicaciones.

50

55

En un aspecto, en el presente documento se describe un dispositivo para la generación de cristales de un soluto a partir de una solución que comprende un sustrato con una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie heterogénea amorfa:

- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada en la superficie del sustrato;
- 2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución.

60

En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada en la superficie del sustrato comprende una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de los mismos. Como se usa en este documento, "almena" se refiere a características que tienen ángulos agudos, obtusos o rectos, o las combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, "depresiones" se refiere a características no angulares o redondeadas que pueden estar por encima o por debajo, o las

65

combinaciones de las mismas, del plano descrito por la superficie circundante.

5 En algunas realizaciones, la superficie heterogénea amorfa que incorpora la matriz de sitios de nucleación preformada modifica el ángulo de contacto, la tensión de la línea, la humectabilidad o la energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con una solución en comparación con una superficie heterogénea amorfa que carece de una matriz de sitios de nucleación.

10 En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada se somete a ingeniería en la superficie mediante procedimientos manuales, mecánicos o químicos, o las combinaciones de los mismos, para grabar, grabar al aguafuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie. Como se usa en el presente documento, "imprimir aditivamente" se refiere a procedimientos que implican la deposición de una o más capas de un material sobre una superficie tal como, por ejemplo, mediante impresión tridimensional y otras técnicas relacionadas practicadas por los expertos en la materia.

15 En algunas realizaciones, el sustrato es un material que es químicamente resistente a la disolución en la solución. En algunas realizaciones, el sustrato comprende polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el sustrato es un sustrato de vidrio.

20 En algunas realizaciones, el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato. En algunas realizaciones, el segundo sustrato es un material que es químicamente resistente a la disolución en la solución. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende el mismo material que el sustrato con la superficie heterogénea amorfa. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende un material diferente del sustrato con la superficie heterogénea amorfa. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende  
25 polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el segundo sustrato es un sustrato de vidrio.

30 En algunas realizaciones, el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato. En algunas realizaciones, el segundo sustrato es un material que es químicamente resistente a la disolución en la solución. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende el mismo material que el sustrato con la superficie heterogénea amorfa. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende un material diferente del sustrato con la superficie heterogénea amorfa.

35 En algunas realizaciones, el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato que no tiene una superficie heterogénea amorfa.

En algunas realizaciones, el sustrato comprende un medio para el control de la temperatura, o la modulación de la temperatura, o las combinaciones de los mismos.

40 En algunas realizaciones, el sustrato comprende un medio para el control de la temperatura, o la modulación de la temperatura, o las combinaciones de los mismos, que no está expuesto a la solución.

45 En otro aspecto, en el presente documento se describe un kit que comprende una pluralidad de sustratos para generar cristales de un soluto a partir de una solución, en el que cada sustrato:

- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada en la superficie del sustrato;
- 2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución;

50 y en el que cada sustrato comprende una matriz de sitios de nucleación preformada que es idéntico o diferente a otras matrices de sitios de nucleación preformadas en el kit.

55 En algunas realizaciones del kit que se describe en el presente documento, las matrices de sitios de nucleación preformadas en la superficie de los sustratos comprenden una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la superficie de los sustratos que incorporan las matrices de sitios de nucleación preformadas modifica el ángulo de contacto, la tensión de la línea, la humectabilidad o la energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con una solución en comparación con la misma superficie que carece de la matriz de sitios de nucleación preformada. En algunas  
60 realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada se diseña en la superficie mediante procedimientos manuales, mecánicos o químicos, o combinaciones de los mismos, para grabar, grabar al aguafuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie. En algunas realizaciones, el sustrato es un material que es químicamente resistente a la disolución en la solución. En algunas realizaciones, los sustratos comprenden polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno,  
65 divinilbenceno o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de sustratos es igual. En algunas realizaciones, la pluralidad de sustratos es diferente. En algunas realizaciones, el

sustrato es un sustrato de vidrio. En algunas realizaciones, cada sustrato con una superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato. En algunas realizaciones, el segundo sustrato comprende una pluralidad de segundos sustratos. En algunas realizaciones, la pluralidad de segundos sustratos es igual. En algunas realizaciones, la pluralidad de segundos sustratos es diferente. En algunas realizaciones, cada sustrato con una superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato, en el que los sustratos son del mismo material. En algunas realizaciones, cada sustrato con una superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato, en el que los sustratos son de diferentes materiales. En algunas realizaciones, cada sustrato con una superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato que no tiene una superficie heterogénea amorfa. En algunas realizaciones, el kit comprende un medio para el control de la temperatura, o la modulación de la temperatura, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el kit comprende un medio para el control de la temperatura, o la modulación de la temperatura, o las combinaciones de los mismos, que no está expuesto a la solución. En algunas realizaciones, la pluralidad de sustratos está puesta en contacto directo con la misma solución del soluto. En algunas realizaciones, la pluralidad de sustratos está puesta en contacto directo con diferentes soluciones del soluto.

En otro aspecto más, en el presente documento se describe un procedimiento para iniciar la nucleación de cristales de un soluto a partir de una solución del soluto que comprende poner en contacto la solución de soluto con un sustrato que tiene una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie heterogénea amorfa del sustrato:

- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada;
- 2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para generar material cristalino de un soluto a partir de una solución del soluto que comprende poner en contacto la solución del soluto con un sustrato que tiene una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie heterogénea amorfa del sustrato:

- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada;
- 2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para iniciar la nucleación de cristales de un soluto a partir de una solución del soluto, o para generar material cristalino de un soluto a partir de una solución del soluto, o las combinaciones de los mismos, que comprende poner en contacto la solución del soluto con un sustrato que tiene una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie heterogénea amorfa del sustrato:

- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada;
- 2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución.

En algunas realizaciones, la solución del soluto está, o se vuelve, sobresaturada con el soluto.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende al menos una etapa adicional de calentamiento, enfriamiento o modulación térmica del sustrato y la solución del soluto a una temperatura que es diferente de la temperatura ambiente y a continuación calentamiento, enfriamiento o modulación térmica de la solución del soluto y sustrato para dar una solución sobresaturada a una temperatura igual o diferente a la temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el aislamiento de los cristales que se forman por contacto de la superficie del sustrato con la solución, a partir del sustrato, o la solución, o las combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada comprende una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la superficie heterogénea amorfa que incorpora la matriz de sitios de nucleación preformada modifica el ángulo de contacto, la tensión de la línea, la humectabilidad o la energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con la solución en comparación con la misma superficie que carece de la matriz de sitios de nucleación preformada.

En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada se diseña en la superficie mediante procedimientos manuales, mecánicos o químicos, o las combinaciones de los mismos, para grabar, grabar al agua fuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie.

En algunas realizaciones, el sustrato es un material resistente a la disolución en la solución.

En algunas realizaciones, el sustrato comprende polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el sustrato es un sustrato de vidrio.

En algunas realizaciones, el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato.

10 En algunas realizaciones, el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato que no tiene una superficie heterogénea amorfa.

En un aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para hacer crecer cristales de un soluto a partir de una solución del soluto, que comprende:

15 a) poner en contacto la solución sobresaturada del soluto con un sustrato que tiene una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie del sustrato:

20 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación preformada;  
2) se coloca en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones que son estáticas, dinámicas o de flujo, o las combinaciones de las mismas; y  
3) es químicamente resistente a la disolución en la solución; y

25 b) opcionalmente calentar, enfriar o modular térmicamente el sustrato y la solución del soluto a una temperatura diferente de la temperatura ambiente y a continuación calentar, enfriar o modular térmicamente la solución del soluto y el sustrato para dar una solución sobresaturada a una temperatura que es igual a, o diferente de, la temperatura ambiente.

30 En algunas realizaciones, la etapa b) se lleva a cabo más de una vez. En algunas realizaciones, la solución del soluto está, o se vuelve, sobresaturada con el soluto.

También se describe en el presente documento un material cristalino que se obtiene a partir de cualquier procedimiento de cristalización que se describe en el presente documento.

35 En un aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para producir una topografía de cristalización que comprende incorporar una matriz de sitios de nucleación preformada en la superficie de un sustrato.

40 En algunas realizaciones, el sustrato es un material que es químicamente resistente a la disolución en la solución a partir de la cual se produce la cristalización. En algunas realizaciones, el sustrato comprende polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el sustrato es un sustrato de vidrio. En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada en la superficie del sustrato comprende una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la superficie del sustrato que incorpora las matrices de sitios de nucleación preformadas modifica el ángulo de contacto, la tensión de la línea, la humectabilidad o la energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con una solución en comparación con la misma superficie que carece de la matriz de sitios de nucleación preformada. En algunas realizaciones, la matriz de sitios de nucleación preformada se diseña en la superficie del sustrato mediante procedimientos manuales, mecánicos o químicos, o las combinaciones de los mismos, para grabar, grabar al aguafuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie.

### Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. Posibles variantes de la forma sólida para un solo material sólido.  
Figura 2. Modelo teórico de superficie plana para nucleación que muestra los requisitos de tamaño para el Núcleo de Transformación.  
Figura 3. Núcleo en forma de cubierta que se forma en una superficie convexa a partir de la cual se obtiene el factor de forma  $f(m, x)$  de la ecuación 6.  
60 Figura 4. Líquido en forma de cubierta en una superficie convexa que muestra las tangentes interfaciales utilizadas en la tensión de línea.  
Figura 5. Probabilidades de nucleación en sustratos sólidos cristalinos y sustratos sólidos amorfos.  
Figura 6. Motivos de nucleación (fila superior) a modo de ejemplo utilizados en la presente invención y su aspecto físico en un sustrato amorfo (fila inferior).  
65 Figura 7. Resultados de la densidad de nucleación y distribución del tamaño cristalina para el sistema  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ .

Figura 8. Localización de la nucleación y crecimiento cristalino de ácido acetilsalicílico en superficies de nucleación modificadas por ingeniería y el comportamiento aleatorio de la superficie de control.

### Descripción detallada de la invención

5 La fase sólida puede existir en una diversidad de formas que van desde materiales amorfos sin un orden de largo alcance a sólidos cristalinos que exhiben un alto grado de orden de largo alcance con una distribución espacial interatómica consistente en todo el cristal. Los átomos, iones o moléculas en un cristal ocupan de forma consistente ubicaciones relacionadas con la simetría a través de una red cristalina para dar una fase sólida altamente pura que se puede obtener de manera consistente, conveniente y rentable.

Numerosas propiedades fisicoquímicas importantes derivan del orden constante de largo alcance en los materiales cristalinos, y estas incluyen propiedades que son importantes tanto en producción como en uso:

- 15 1 Volumen molar
- 2 Densidad
- 3 Índice de refracción
- 4 Color
- 5 Conductividad térmica y eléctrica
- 20 6 Capacidad calorífica
- 7 Temperaturas de fusión y sublimación
- 8 Solubilidad en equilibrio
- 9 Velocidad de disolución
- 10 Propensión a la formación de solvatos o hidratos.
- 25 11 Reactividad química
- 12 Estabilidad del sólido cristalino.
- 13 Estabilidad física (por ejemplo, dureza, fragilidad, compresibilidad, etc.)
- 14 Morfología
- 15 Distribución de tamaño de cristal
- 30 16 Facilidad de procesamiento

El orden constante de largo alcance en los materiales cristalinos proporciona un comportamiento químico predecible que es comercialmente importante, con aplicaciones en los campos alimentario, farmacéutico, cosmético, agrícola, de química fina y de bioingeniería. Cada una de estas áreas de aplicación exige un material de alta pureza con un rendimiento constante, en especial cuando se trata de uso humano. Los materiales cristalinos son adecuados para aplicaciones que tienen requisitos de pureza y rendimiento regulados debido a la facilidad de recuperación del producto de las corrientes de procedimiento de múltiples componentes, alta pureza que a menudo se proporciona en una sola operación de separación, la escalabilidad del procedimiento de cristalización en sí y la economía de procedimiento favorable. Desde una perspectiva de uso final, los materiales cristalinos son estables durante el almacenamiento a largo plazo y con frecuencia tienen propiedades termodinámicas y cinéticas reproducibles.

El procedimiento de cristalización es una técnica operativa y económicamente preferente que se ha explotado durante un largo tiempo debido a las propiedades consistentes exhibidas por los materiales cristalinos. Es importante separar el comportamiento reproducible y predecible de los materiales cristalinos del propio procedimiento de cristalización, ya que este último involucra sorprendentemente varias etapas clave para las cuales la comprensión de su mecanismo aún se sigue comprendiendo poco y es inherentemente impredecible. El comportamiento predecible de los materiales cristalinos es tan valioso en las actividades comerciales que la falta de comprensión subyacente de las primeras etapas del procedimiento de cristalización se pasa por alto con frecuencia hasta que surge un problema.

Aunque un cristal dado que contiene cualquier combinación de átomos, iones o moléculas exhibirá un orden constante de largo alcance, pueden existir diferentes formas de cristal con composiciones químicas idénticas o ligeramente diferentes y se pueden formar en cualquier momento. El fenómeno genérico se conoce como variación de la forma sólida y como variantes de la forma sólida cuando se refiere a un grupo específico que incluye una entidad química de interés. Entre las variantes de la forma sólida hay varias clasificaciones diferentes, definiéndose rigurosamente el polimorfismo como la existencia de más de una forma cristalina de una composición química dada cuyos constituyentes ocupan diferentes ubicaciones en la red. Cuando la conformación, orientación o ubicación de un átomo o ion en la red es diferente para dos cristales de composición química idéntica, el empaquetamiento de la celdilla unidad es diferente, y el resultado es un nuevo polimorfo, y el polimorfismo conformacional es la aparición común de moléculas que tienen un alto grado de flexibilidad.

La presencia de una molécula de disolvente en los huecos de la red; es decir, disolvente que no interactúa con la entidad química de interés, produce un compuesto de inclusión y tales variantes en forma sólida son frágiles ya que se puede producir con facilidad la pérdida de disolvente para dar un cambio en la forma cristalina. Cuando la forma del cristal cambia mediante la adición de una molécula de disolvente que interactúa directamente con los átomos, iones o moléculas de interés, se forma un aducto molecular o de solvato que es comparativamente más estable

frente a la pérdida de disolvente que los compuestos de inclusión. Estas especies solvatadas, junto con polimorfos, se denominan colectivamente en el presente documento variantes de forma sólida.

5 De lo expuesto anteriormente, pueden existir varias fases para un material sólido y la Figura 1 comunica en parte las complejidades que surgen de la variación de forma sólida. Por ejemplo, los compuestos orgánicos complejos dan lugar con frecuencia a polimorfismo de empaquetamiento o polimorfismo conformacional, y estas diferentes formas cristalinas pueden aparecer en prácticamente cualquier etapa del procedimiento de desarrollo y fabricación. Cuando se produce la formación de aductos, la inclusión intencionada o no de disolventes u otras moléculas puede brindar numerosas posibilidades diferentes, algunas diseñadas de forma intencionada para mejorar las propiedades seleccionadas de un cristal dado (por ejemplo, los llamados cocristales), mientras que otras pueden proporcionar variantes como resultado de la incorporación fortuita de impurezas, disolvente residual u otros componentes provenientes de actividades de síntesis o producción. A pesar de la estructura interna consistente exhibida por los materiales cristalinos, la Figura 1 muestra que pueden existir numerosas variantes de forma sólida, y tal variabilidad es una faceta complicada e impredecible de los procedimientos de fabricación que se basan en la cristalización como técnica de separación.

15 Los efectos de la variación de la forma sólida en las 16 propiedades físico-químicas que se han mencionado anteriormente pueden ser importantes; por ejemplo, se han de considerar las diferentes propiedades, usos y valores del diamante y el grafito como dos variantes en forma sólida de carbono elemental. En términos más generales, los campos alimentario, farmacéutico, cosmético, agrícola, químico fino y de bioingeniería ponen un énfasis especial en las propiedades de uso final seleccionadas de los materiales cristalinos. Más específicamente, el uso comercial en estos campos implica por lo general un producto regulado que tiene estándares de pureza inicial y final, almacenamiento en anaquel antes del uso y rendimiento de uso final predecibles. Los ingredientes farmacéuticos activos (API) utilizados en los medicamentos se pueden tomar como ejemplo ilustrativo, en el que la solubilidad de equilibrio *in vivo* del API es de importancia crítica en uso. Debido a que las diferentes variantes de forma sólida pueden tener diferentes propiedades, incluyendo solubilidades en equilibrio y velocidades de disolución muy diferentes, los organismos reguladores de la atención médica de los Estados Unidos de América e internacionales aplican directrices estrictas para garantizar unas características de uso consistentes para los productos farmacéuticos. Las propiedades de importancia crítica para los API incluyen alta pureza inicial, distribución del tamaño del cristal, estabilidad de almacenamiento del sólido, estabilidad física durante la administración, velocidades de disolución del cristal y facilidad general de fabricación. Muchas de estas propiedades exhiben interdependencias (por ejemplo, una distribución del tamaño amplia de los cristales puede dar una amplia gama de velocidades de disolución), que se complican aún más debido a las muy diferentes condiciones de uso final: productos farmacéuticos en seres humanos o animales, aplicaciones agrícolas en diferentes entornos geoquímicos, o usos en bioingeniería que pueden implicar la mejora o inhibición de la formación de biopelículas.

20 Para recalcar la complejidad y la amplitud de los problemas que surgen de la variación de forma sólida tenemos experiencias comerciales publicitadas en las que los productos se vieron afectados negativamente por la variación de forma sólida después de que las autoridades reguladoras hubieran aprobado el uso humano de una forma sólida de API específica. La historia del ejemplo admonitorio del producto Ritonavir de Abbott Laboratories (comercializado como Norvir®) se ha utilizado ampliamente como estudio de un caso preferente del polimorfismo y sus implicaciones comerciales. El ritonavir es una molécula orgánica de 98 átomos para el tratamiento del VIH y se desarrolló con éxito a través de ensayos clínicos y recibió la aprobación reglamentaria para su uso humano en forma de gel líquido. Aproximadamente dos años después del lanzamiento comercial, un lote de cápsulas de ritonavir falló en una prueba de disolución regulada debido a la aparición de un polimorfo de disolución más lenta y previamente desconocido. La disponibilidad mundial de ritonavir se vio comprometida, y los inventarios institucionales se pusieron en cuarentena durante este tiempo dado que el medicamento estaba formando una estructura cristalina diferente que lo hacía menos soluble, de modo que no se liberaba la dosis correcta del medicamento dentro del cuerpo del paciente.

45 Se requirió un esfuerzo de reformulación orientado que incluyó nuevos estudios de farmacocinética, cambios de producción, revisiones de control de calidad, requisitos de almacenamiento y reenvío a las diversas autoridades reguladoras, y se completó en aproximadamente 12 meses a un coste considerable. Se estima que las ventas perdidas por sí mismas excedieron los 125 millones de dólares, lo que no tiene en cuenta los costes de nuevo desarrollo y el deterioro del renombre comercial derivado del daño a las marcas comerciales Ritonavir y Abbott Laboratories.

50 Un factor que complica la cristalización como técnica de separación y purificación es la diversidad de entidades químicas que se utilizan en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, cosméticas, agrícolas, químicas finas y de bioingeniería. Las clases de entidades químicas pueden variar desde átomos e iones de bajo peso molecular hasta moléculas orgánicas complejas y macromoléculas capaces de diferentes disposiciones conformacionales e interacciones intermoleculares complejas. El espectro de peso molecular de los API por sí mismo puede abarcar desde una molécula pequeña hasta el intervalo macromolecular biológico, y este último a menudo está predispuesto al polimorfismo conformacional y a la variación de la forma sólida basada en la solvatación. Los mecanismos terapéuticos y de captación muy diferentes de los API requieren a menudo una funcionalización química diferente, y esto puede afectar a la conformación, las interacciones intramoleculares, las interacciones intermoleculares y la formación de solvatos en el cristal.

La investigación y el desarrollo farmacéuticos actuales implican con la mayor frecuencia la preparación, producción y uso de las formas de sal de los API y, de forma más específica, que el API contenga una funcionalidad ionizable cuya carga esté neutralizada con un contraión biológicamente aceptable. Las ventajas de la formación de sal para los API son numerosas e incluyen la unificación de ciertos comportamientos *in vivo* incluso para clases muy diferentes de moléculas de API. Además, la introducción de una funcionalidad ionizable, habitualmente grupos de ácido carboxílico, puede facilitar el aislamiento del API como material cristalino con las ventajas resultantes que abarcan la síntesis y el aislamiento para uso *in vivo*. Cuando el objetivo es el uso *in vivo*, la formación de la sal puede mejorar la solubilidad en agua del API, lo que produce beneficios desde la producción hasta la farmacocinética.

Después de la formación de la sal, el aislamiento de un sólido cristalino simplifica la purificación y la manipulación, y para un API dado existe una susceptibilidad reducida de reacción durante el almacenamiento en el anaquel del producto intermedio o final. También se prefieren los API cristalinos, ya que facilitan su uso en comprimidos y cápsulas, que dominan los diversos procedimientos de administración farmacéutica. Como resultado de estos estudios, casi el 50 % de todas los API en uso hoy en día se producen como formas de sal para impartir solubilidad en agua y para que los materiales se puedan aislar en forma de sólidos cristalinos con producción, uso y ventajas económicas concomitantes.

A pesar de las numerosas e importantes ventajas de la formación de una sal para una diversidad de usos comerciales y de desarrollo, la formación de la sal aumenta en última instancia la probabilidad de variación de la forma sólida. El uso de coiones de sal puede dar lugar a un comportamiento estructural itinerante en el que surgen diferentes interacciones intra o intermoleculares entre los respectivos cationes y aniones (por ejemplo, interacciones de formación de puentes, interacciones bifurcadas, etc.). La introducción de una funcionalidad de formación de sal también aumenta la complejidad molecular de la molécula y puede aumentar la probabilidad de variación de forma sólida. La presencia de restos iónicos polarizados también aumenta la propensión a la formación de hidratos y solvatos, lo que puede conducir a una diversidad de variaciones potenciales (Figura 1) y puede afectar a la estabilidad de almacenamiento, la solubilidad y las velocidades de disolución.

Incluso los procedimientos de cristalización optimizados pueden verse afectados negativamente por la variación de la forma sólida. Por ejemplo, el uso de cristales semilla en actividades de investigación, desarrollo y producción es una práctica común. A medida que las semillas se purifican cada vez más después de la recristalización repetida de un lote a otro, la pureza creciente puede desplazar el equilibrio y la energía del sistema para dar una nueva variante de forma sólida. Desde una perspectiva operativa, las tendencias comerciales que implican múltiples instalaciones de desarrollo y producción de API en regiones geográficas ampliamente variables con diferente personal y condiciones ambientales diferentes introducen muchas variables no reproducibles. Estos factores reducen, de forma colectiva, la previsibilidad de una operación de cristalización; sin embargo, son prácticas convencionales en la actualidad que requieren el desarrollo de procedimientos de cristalización nuevos y mejorados.

Para recalcar la omnipresencia de la variación de la forma sólida en actividades comercialmente relevantes, se ha informado que: "... el polimorfismo es un fenómeno generalizado observado en más de la mitad de las sustancias farmacológicas ..." y que: "Se sabe que el polimorfismo y el seudopolimorfismo influyen cada etapa de la fabricación y el almacenamiento de productos farmacéuticos" (Stahl, P. H.; Wermuth, C. G. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use. Wiley-VCH: Nueva York, 2002).

Dada la naturaleza intensamente regulada de la producción y el uso farmacéuticos, las decisiones que rodean a la forma de sal cristalina de un API se hace avanzar a síntesis a escala superior, estudios farmacocinéticos, ensayos clínicos y al mercado es tan importante que se ha descrito como "irreversible": "La situación actual del desarrollo industrial de medicamentos hace que la decisión concerniente a la sal sea casi irreversible, porque un cambio en la forma de la sal durante las etapas posteriores del desarrollo de un candidato a medicamento implica altos gastos adicionales y una pérdida de tiempo valioso..." (Stahl, P. H.; Wermuth, C. G. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use. Wiley-VCH: Nueva York, 2002).

De ese modo, se han reconocido ampliamente los beneficios de un API cristalino altamente puro que exhibe un comportamiento químico constante durante la vida útil del producto y en la actualidad se regulan desde el desarrollo de los candidatos a fármacos hasta su uso comercial. Sin embargo, este modelo y las reglamentaciones asociadas están sujetos a una falta inherente de previsibilidad planteada por la variación de la forma sólida, y se prevé que los aumentos ya observables en este fenómeno crecerán como resultado de las estrategias de desarrollo actuales que favorecen la formación de sal y la complejidad siempre creciente de las moléculas de API utilizadas en medicina. Esta divergencia de la previsibilidad sugiere que se necesiten nuevos procedimientos de cristalización para mejorar la previsibilidad química y económica, y que cualquier mejora de este tipo se debe adaptar a la creciente diversidad de entidades químicas que se utilizan, o se utilizarán comercialmente, en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, cosméticas, agrícolas, de química fina y de bioingeniería.

A pesar del estudio empírico durante más de un siglo y el interés recientemente expandido por el diseño de cristales, los tratados principales sobre procedimientos de cristalización comercialmente pertinentes aún reconocen que

muchos profesionales todavía tratan la cristalización como un arte.

Con el estado actual de la tecnología de cristalización que todavía se menciona constantemente en la bibliografía científica como un "arte", está claro que se necesitan procedimientos nuevos y racionales para identificar y controlar la variación de la forma sólida. Nuevas capacidades que permiten una detección de forma sólida más rápida y fácil para facilitar la identificación de polimorfos, solvatos y otras variantes de forma sólida antes de avanzar a la producción y, de forma ideal, antes de que ingresen en el mercado donde surgen riesgos de uso final y problemas de seguridad pública. Este enfoque para el análisis sistemático de formas sólidas emplea una filosofía combinatoria de alto rendimiento que carece de las ventajas económicas y técnicas de una metodología racional. Muchos enfoques combinatorios no son eficaces en masa y requieren cantidades comparativamente grandes de material experimental (que generalmente es escaso) que se distribuye en decenas de miles de pocillos con diferentes condiciones químicas, lo que hace que la recuperación sea casi imposible. Un enfoque de detección racional tendrá requisitos de masa más bajos, será más eficaz con el material disponible y permitirá que más compuestos objetivo ingresen a las pruebas farmacodinámicas en una etapa anterior al reducir la carga de síntesis en la etapa temprana. De casi la misma importancia, son necesarios nuevos procedimientos de cristalización racional que sean aplicables a diversas especies químicas, ya que la naturaleza cada vez más compleja de los productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos, agrícolas, de química fina y de bioingeniería probablemente dará lugar a una mayor variación de forma sólida.

También se necesitan nuevos procedimientos de cristalización desde una perspectiva comercial, ya que las técnicas racionales que pueden hacer que la producción sea más predecible, escalable y rentable son económicamente ventajosas. Los procedimientos de cristalización racional también deben abordar las condiciones dispares de las actividades de descubrimiento y producción, ya que hay más variables disponibles a escala de laboratorio, mientras que las restricciones económicas, de ingeniería y regulatorias limitan el intervalo de variables prácticas a escala de producción. Las nuevas herramientas de cristalización deben ser duraderas y útiles en diversas condiciones de laboratorio:

- 1 Diferentes entidades químicas (por ejemplo, átomos, iones, moléculas) y clases químicas
- 2 Disolventes diferentes
- 3 Temperaturas
- 4 Presiones (para evaporación)
- 5 Reactivos para reducir la solubilidad
- 6 Factores de forma experimental versátiles

- a Vasos
- b Superficies incorporadas a una pared del recipiente
- c Superficies adheridas a una pared del recipiente
- d Módulo suspendido en contacto con la solución
- e Módulo que flota libremente en contacto con una solución
- f Cualquiera de los medios anteriores en contacto intermitente con una solución.

A escala de producción surgen numerosas limitaciones operativas y se vuelven más importantes factores de ingeniería y orientación económica:

- 1 Durabilidad física
- 2 Estabilidad química
- 3 Estabilidad en condiciones de cizalladura
- 4 Factores de forma versátiles

- a Vasos
- b Superficies incorporadas a una pared del recipiente
- c Superficies adheridas a una pared del recipiente
- d Módulo suspendido en contacto con la solución
- e Módulo que flota libremente en contacto con una solución
- f Cualquiera de los medios anteriores en contacto intermitente con una solución.

Los requisitos de que los nuevos procedimientos de cristalización racional acomodan diversas químicas a escalas muy diferentes para productos con diferentes requisitos de uso final es un desafío importante que se aborda dentro del alcance de la presente invención.

Las teorías actuales que describen el procedimiento de cristalización se basan en la premisa de que la cristalización es esencialmente un procedimiento de reconocimiento molecular que ocurre a gran escala.

En este contexto, el reconocimiento molecular se define en el presente documento para incluir el reconocimiento de todas las especies químicas pertinentes incluyendo átomos, iones, moléculas y macromoléculas biológicas. En su forma más simple, el reconocimiento molecular se puede considerar como el depósito de moléculas de manera

ordenada sobre una red. Solo las moléculas que encajan bien se depositan en la superficie de la red.

5 El orden constante de largo alcance de un cristal deriva de los procedimientos de autoensamblaje y reconocimiento molecular mencionados anteriormente, en los que los solutos con una energía favorable se transfieren a través de un límite de fase y se rechazan las impurezas. Es importante comprender el mecanismo y el papel de este procedimiento de reconocimiento en la cristalización, ya que es difícil recrear las capacidades de reconocimiento universal para diversas clases químicas de solutos; sin embargo, el reconocimiento es necesario para producir materiales cristalinos.

10 El procedimiento de cristalización está dirigido termodinámicamente y controlado cinéticamente, y estas observaciones tienen implicaciones importantes. En los sistemas que dan sólidos cristalinos de forma relativamente rápida, rara vez el primer cristal obtenido forma la estructura termodinámicamente más estable. En muchos casos, que incluyen ejemplos notables que implican el producto Ritonavir de Abbott, los materiales cristalinos obtenidos inicialmente y administrados a los pacientes eran productos controlados cinéticamente y no eran materiales  
15 cristalinos termodinámicamente estables. En tales casos, el producto controlado cinéticamente tiene el potencial químico suficiente para conducir los diversos equilibrios hacia su formación y tal condición puede inhibir el aislamiento de la forma termodinámicamente estable. Solo después de encontrar algún cambio en las variables del sistema, tal como una diferencia inesperada en la velocidad de enfriamiento como resultado de una transferencia a escala de planta, exposición a diferentes contaminantes formados por partículas (ya sea en el aire o residual en el  
20 equipo), envejecimiento de la solución, etc., se produce la estructura cristalina termodinámicamente estable.

Debido a que diferentes factores termodinámicos y cinéticos tienen influencia en el procedimiento de cristalización en diferentes etapas, el procedimiento de cristalización se separa en dos procedimientos por etapas. La génesis cristalina se conoce como nucleación, en la que las especies de interés se agregan en primer lugar, ya sea a partir  
25 de la masa fundida o de la solución, mientras permanecen solubles en la fase líquida. Al alcanzar un tamaño crítico que depende del sistema, el agregado sufre una mayor autoorganización para formar un cristal precursor o semilla. Después de la nucleación, el cristal original entra en la segunda etapa, denominada crecimiento cristalino, y a continuación progresa a partir de una semilla microcristalina a un sólido macrocristalino mediante la adición de las especies de interés en las diferentes caras del cristal. Como resultado de la estructura altamente organizada de los  
30 sólidos cristalinos y la facilidad con la que se estudian, las teorías prevalecientes se extrapolan frecuentemente a la inversa y se basan en modelos que implican una adición ordenada y sistemática de especies individuales para proporcionar modelos de nucleación gradual y crecimiento de cristales.

La nucleación es un primer paso importante en el procedimiento de cristalización, y es un punto de partida atractivo para el desarrollo de procedimientos de cristalización nuevos y mejorados. Las estructuras cristalinas de proteínas son fundamentales para el éxito del diseño racional de medicamentos y otras aplicaciones biotecnológicas; sin embargo, obtener cristales de alta calidad plantea un gran problema para el progreso. La nucleación se reconoce como el primer paso que afecta al resto del procedimiento de cristalización, por lo que el control de la nucleación resolvería muchos problemas de la cristalización en su concepción.  
35

La nucleación se produce mediante dos mecanismos principales: nucleación primaria y nucleación secundaria. La primera, por definición, se produce en ausencia de superficies cristalinas, mientras que la nucleación secundaria requiere la presencia de alguna superficie cristalina alrededor de la que se produzca la agregación y el crecimiento. En ausencia de superficies cristalinas, la nucleación primaria se puede producir mediante vías homogéneas o  
45 heterogéneas. La nucleación primaria homogénea es un evento espontáneo en el que los agregados de solutos alcanzan el tamaño crítico necesario para la nucleación, y es bastante rara fuera del laboratorio y prácticamente imposible de observar a escala de procedimiento dada la diversidad de materiales en contacto intencionado e involuntario con una solución sobresaturada en instalaciones de producción comercial. La nucleación primaria heterogénea implica la presencia de materia extraña, tal como partículas o especies químicas (por ejemplo, solventes, aditivos, impurezas, etc.) que sirven para reducir la barrera de energía para la nucleación. Dada la ubicuidad de los contaminantes particulados, incluso en el laboratorio más cuidadosamente controlado y en los entornos de instalaciones certificadas de buena fabricación (cGMP), la nucleación primaria heterogénea es el mecanismo de nucleación primaria encontrado de forma más frecuente.  
50

La presencia de un contaminante formado por partículas, sólidos en suspensión, polvo o una impureza química puede reducir la energía del sistema para proporcionar agregados del tamaño crítico necesario para la nucleación. En sistemas contaminados con partículas, la nucleación se puede producir a niveles más bajos de sobresaturación, y los estudios han demostrado que la nucleación primaria heterogénea es más común en sistemas en los que el tamaño y la estructura del contaminante se parecen mucho a los de las especies que se cristalizan. La investigación ha demostrado que la disparidad estructural entre el contaminante y la entidad química objetivo debe ser inferior a un 15 % para que haya una ventaja energética, y esta observación significa que los productos químicos estructuralmente similares o los contaminantes del procedimiento pueden afectar de forma negativa a los procedimientos de cristalización.  
55

65 Aunque la "materia extraña sometida a ingeniería" puede parecer inicialmente prometedora como medio de inducir nucleación primaria heterogénea en las proporciones de sobresaturación más bajas, las interacciones de dicha

"materia extraña" con un agregado de soluto en crecimiento antes de la nucleación es impredecible. En el contexto de la producción de cGMP de productos regulados alimentarios, farmacéuticos, cosméticos y productos relacionados, tal comportamiento impredecible no es aceptable.

5 La nucleación secundaria implica una superficie cristalina original presente en la solución, y se usa de manera intermitente en las cristalizaciones de laboratorio que involucran un cristal semilla previamente aislado que se usa para inducir la nucleación. A escalas más grandes, los cristales semilla se pueden introducir mediante una reserva o "retención" en el recipiente del reactor de una parte de un procedimiento de cristalización previo. Las cristalizaciones a escala de procedimiento también implican agitación mecánica que puede conducir a la fragmentación microcristalina, o "crianza por colisión", en condiciones de cizalladura que produzcan fragmentos que se dispersen y puedan servir como centros de nucleación. Aunque mal entendidas, se han postulado varias etapas de nucleación secundaria:

- 15 1 Generación de fragmentos microcristalinos del cristal original mediante agitación mecánica que hace que los cristales colisionen con otros cristales, con el recipiente o con el aparato de mezcla
- 2 Dispersión de los fragmentos microcristalinos en el medio por mezcla o difusión
- 3 Agregación de solutos alrededor del fragmento microcristalino para producir agregados con el tamaño crítico necesario para la nucleación.

20 La nucleación secundaria que usa cristales semilla del compuesto original en condiciones de alta cizalladura puede ser conveniente, pero no es universalmente aplicable: no existen cristales semilla adecuados para la mayoría de las nuevas entidades químicas. La estrategia de nucleación secundaria por siembra es limitante en la fase de descubrimiento de una nueva entidad química en la que los cristales semilla aún no están disponibles o pueden ser difíciles de aislar. Además, el uso de cristales semilla en actividades de producción requiere una costosa calibración empírica a gran escala de las condiciones de cizalladura y, lo que es más importante, la nucleación secundaria aún puede producir productos controlados cinéticamente en lugar de la forma cristalina termodinámicamente estable deseada. La nucleación secundaria mediante siembra de cristales también adolece de un comportamiento impredecible ya que las reservas de semillas se pueden someter a una purificación gradual como resultado de recristalizaciones repetidas, lo que puede conducir a una mayor probabilidad de variación de la forma sólida a medida que los componentes traza de la solución (por ejemplo, impurezas, partículas, etc.) se reducen de forma gradual y surgen de forma involuntaria nuevas condiciones de cristalización. Dadas estas limitaciones, el énfasis de la presente invención se realiza en la nucleación primaria heterogénea.

35 La sobresaturación es la fuerza impulsora para la nucleación, y se produce cuando la concentración de soluto en la solución excede la solubilidad de soluto en equilibrio determinada en condiciones termodinámicas ideales. La relación de sobresaturación es un componente importante del marco teórico para la nucleación, y se define como:

$$\text{Ec. 1} \quad S = \frac{C}{C_0}$$

40 donde C es la concentración de soluto en la solución sobresaturada y  $C_0$  es el límite de solubilidad termodinámico.

La sobresaturación es un estado termodinámico metaestable no ideal en el que perturbaciones diminutas pueden conducir a cambios significativos que pueden incluir la formación de precipitados amorfos o sólidos cristalinos. El estado metaestable de sobresaturación descansa con frecuencia cerca de un punto de inflexión energético, donde puede existir un pozo energético de estabilidad superficial para un sistema que contiene soluto a una concentración que excede su valor en equilibrio termodinámico, y la barrera de energía de activación para salir de un estado metaestable de este tipo puede ser bastante pequeña y puede resultar de perturbaciones menores en el sistema. El tamaño y la forma de la zona metaestable están relacionados con la proporción de sobresaturación de una solución, en donde una sobresaturación más alta en realidad disminuye la metaestabilidad y una sobresaturación más baja tiene una región metaestable comparativamente más grande.

Hay cuatro medios principales para manipular la sobresaturación, y estos incluyen:

- 55 1 Cambio de temperatura
- 2 Evaporación de disolvente
- 3 Cambios en la composición del disolvente para reducir la solubilidad del soluto
- 4 Reacción química.

60 Estos cuatro procedimientos son convenientes para la cristalización a escala de laboratorio, pero la mayoría de las operaciones a escala de procedimiento enfatizan las técnicas térmicas y de evaporación, ya que no requieren la adición de productos químicos que implicarían costes adicionales y procesamiento posterior. Las escalas de laboratorio y procedimiento también utilizan diferentes niveles de sobresaturación. Las cristalizaciones a escala de laboratorio generalmente se centran en el aislamiento para el análisis de una nueva entidad química, y estos estudios generalmente se realizan a baja sobresaturación ya que hay cantidades limitadas de la nueva entidad

química disponibles en la etapa de desarrollo. La cristalización a escala de procedimiento se dirige con mayor frecuencia a la pureza, el rendimiento y la eficiencia general del procedimiento, de modo que se emplea niveles intermedios de sobresaturación. Las operaciones de cristalización llevadas a cabo a niveles muy altos de sobresaturación son menos comunes debido a la disminución de la metaestabilidad de la solución, haciéndola susceptible de cambios drásticos (por ejemplo, precipitación amorfa, formación de monolitos, evento térmico desbocado, etc.) que dan cualidades de producto indeseables.

Una solución sobresaturada metaestable se basa en la nucleación para reducir la energía libre del sistema, lo que permite el retorno a las condiciones de equilibrio. Antes de la nucleación, el soluto en una solución sobresaturada se concentra lo suficiente para producir agregados o grupos intermoleculares, y esta agregación representa la primera etapa del procedimiento de reconocimiento aplicado a la cristalización. Los agregados se forman en solución para maximizar los efectos favorables de la solvatación, minimizar los efectos desfavorables de la solvatación, optimizar las interacciones intermoleculares y reducir la energía libre del sistema en general. Como parte del procedimiento de agregación, los solutos coalescen y las especies termodinámicamente indeseables se excluyen de la estructura de fase de solución fluxional, con el resultado de ser un primer paso en el procedimiento de reconocimiento dinámico que evoluciona a través de las etapas de nucleación y crecimiento de cristales. Un resultado fácilmente observable de la agregación es el aumento de la viscosidad que generalmente acompaña a los aumentos en la sobresaturación, donde la viscosidad de la solución puede aumentar de forma drástica como resultado de la agregación de solutos. Los cambios de viscosidad son más pronunciados para las soluciones sobresaturadas que para las soluciones insuficientemente saturadas, y los experimentos de sedimentación en columna que utilizan soluciones salinas sobresaturadas han informado gradientes de concentración de agregados que se usaron en cálculos preliminares de tamaño de conglomerado.

El examen de los factores termodinámicos para la nucleación primaria homogénea proporciona una base simplificada e instructiva para la comprensión de la nucleación primaria heterogénea y es un análisis de sensibilidad con respecto a las variables importantes de forma práctica. La nucleación primaria homogénea de un agregado esférico ideal implica la diferencia entre la energía libre positiva requerida para la formación de la superficie del núcleo en una solución sobresaturada y el cambio negativo de energía libre para la transformación de fase (es decir, el núcleo agregado en solución en transición a un cristal microscópico):

$$\text{Ec. 2} \quad \Delta G = 4\pi r^2 \sigma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v$$

donde  $r$  es el radio de un agregado de soluto esférico ideal,  $\sigma$  es la tensión superficial, y  $\Delta G_v$  es el cambio de energía libre para la transformación de fase.

El primer término es "resistencia a la nucleación" y corresponde a la energía libre requerida para formar la superficie del núcleo en un microdominio de la solución sobresaturada, y esta barrera energética se presenta mediante las fuerzas de tensión superficial cohesivas de la solución sobresaturada que se resisten al reordenamiento y al desplazamiento a medida que se forma el núcleo subcrítico. El segundo término que implica  $\Delta G_v$  representa la energía favorable de la transformación de fase y corresponde a una disminución de energía del sistema a medida que se sale del estado metaestable y comienza la cristalización.

Al minimizar  $\Delta G$  en la Ecuación 2 con respecto al radio de agregado  $r$  e introducir la ecuación de Gibbs-Thompson para el crecimiento de agregados, se puede obtener una energía libre crítica para la nucleación:

$$\text{Ec. 3} \quad \Delta G_{cr} = \frac{16\pi\sigma^3 v^2}{3(kT \ln S)^2}$$

donde  $v$  es el volumen molecular,  $T$  la temperatura del sistema, y  $S$  la proporción de sobresaturación de la Ecuación 1.

Para los agregados más pequeños que el tamaño crítico necesario para la nucleación, es preferible termodinámicamente la difusión del soluto lejos del grupo. Más allá de un tamaño de agregado crítico que depende del soluto y el sistema; sin embargo,  $\Delta G_{er}$  tiende a un crecimiento de agregados negativo y espontáneo. Esta etapa es en la que la adición de soluto mediante un agregado está favorecida termodinámicamente y se logra la energía libre crítica de nucleación, que se produce cerca del punto de inflexión energética en un sistema metaestable. Dicho de otro modo, las soluciones sobresaturadas son metaestables dado que se necesita un agregado de tamaño crítico para aliviar la condición de no equilibrio de sobresaturación.

El punto en el que el agregado alcanza el tamaño crítico para que la adición de soluto se vuelva termodinámicamente favorable depende en gran medida de las propiedades químicas del soluto, la solución sobresaturada y las condiciones macroscópicas. Las Ecuaciones 2 y 3 muestran que la energía libre que favorece la formación y el crecimiento de agregados a un tamaño crítico depende de una serie de variables que incluyen el

volumen específico del soluto y el radio de agregado, los cuales son en gran medida valores dependientes de las moléculas y los sistemas y su manipulación solo es práctica en estudios fenomenológicos de laboratorio y no en investigación comercial o actividades de producción. Las dos variables más convenientemente manipuladas para las cristalizaciones a escala de procedimiento son la proporción de sobresaturación y la temperatura del sistema, y estas se optimizan siempre que sea posible. Existen límites prácticos para estos controles, ya que la cinética de nucleación y crecimiento de cristales pueden verse afectados negativamente por una alta proporción de sobresaturación que reduce la metaestabilidad del sistema y puede conducir a una distribución deficiente del tamaño de los cristales, morfología indeseable, niveles de pureza reducidos y aislamiento del producto controlado cinéticamente en lugar del producto preferente termodinámicamente estable. Como resultado de la compleja interdependencia entre la temperatura y la proporción de sobresaturación y la condición de no equilibrio del estado sobresaturado, por lo general se requiere un enfoque empírico para obtener una comprensión útil de cómo estas variables afectan a un sistema de cristalización dado. Tal enfoque empírico es intensivo en masa, y no es adecuado para la fase de descubrimiento de desarrollo o para actividades de investigación o producción que involucran macromoléculas y proteínas biológicas que son sensibles a la temperatura y con frecuencia pueden exhibir solubilidad itinerante en función de la temperatura.

La variable restante que aparece tanto en la Ecuación 2 como en la Ecuación 3 es la tensión interfacial, o energía superficial, y se ha reconocido su importancia para el procedimiento de cristalización junto con la dificultad de aprovechar su utilidad.

En la práctica actual, la tensión superficial interfacial, o energía superficial, se puede modificar mediante una juiciosa selección de solvente; sin embargo, las operaciones de producción, las pautas regulatorias y la economía del procedimiento exigen con frecuencia que el sistema de disolventes sea acuoso, en especial en el procesamiento de productos alimentarios, farmacéuticos, cosméticos, agrícolas y de bioingeniería, en los que los estándares de pureza son los más estrictos.

Dado que las soluciones sobresaturadas requieren la formación de un agregado de tamaño adecuado para aliviar la condición metaestable de no equilibrio y que las energías superficiales son un aspecto importante de la formación y crecimiento de agregados, la manipulación conveniente y predecible de las energías superficiales en soluciones sobresaturadas sería de utilidad. La manipulación de los agregados de solutos antes, durante y después del procedimiento de nucleación por modificación de la energía superficial es un aspecto importante de la presente invención.

Recordando que la cristalización es un procedimiento dirigido termodinámicamente que está controlado cinéticamente, se justifica una comprensión de los componentes del tiempo. Sustituyendo la Ecuación 3 en una ecuación de velocidad de tipo Arrhenius, donde A y B<sub>0</sub> están relacionados por la velocidad, y la solución de k da:

$$\text{Ec. 4} \quad k = \left[ \frac{-16\sigma^3 v^2}{3 \ln\left(\frac{B_0}{A}\right) T^3 (\ln S)^2} \right]^{\frac{1}{3}}$$

El formato de la Ecuación. 4 muestra magnitudes cúbicas comparables entre  $\sigma$  (una resistencia a la nucleación) y T (por lo general un potenciador de nucleación). El aumento de S también mejora y acelera la nucleación, pero puede reducir de forma drástica la metaestabilidad del sistema al hacer que se formen muchos núcleos con un efecto adverso sobre las propiedades de uso final relacionadas, de las que la distribución del tamaño de cristal es un ejemplo. Para complicar aún más un análisis de sensibilidad se produce el comportamiento itinerante de la solubilidad de los solutos en función de la temperatura para diferentes especies; por ejemplo, las proteínas y otras macromoléculas pueden exhibir una solubilidad decreciente a medida que aumenta la temperatura, mientras que muchas moléculas pequeñas, iones simples y similares exhiben por lo general una solubilidad creciente con un aumento de la temperatura. La ecuación 4 también predice que por encima de una sobresaturación crítica debería haber un crecimiento exponencial; sin embargo, en la práctica existe una temperatura a la que la solución se vuelve demasiado viscosa para nuclearse. Esta disminución de la velocidad en función de la viscosidad está relacionada con el término de energía superficial, ya que la formación de una nueva superficie en la solución sobresaturada altamente viscosa representa un desafío energético y la Ecuación 5 se ha aplicado con éxito a una solución acuosa sobresaturada de ácido cítrico:

$$\text{Ec. 5} \quad B_0 = A \exp\left\{ \frac{-16\pi\sigma^3 v^2}{3k^3 T^3 (\ln S)^2} + \frac{\Delta G_{\text{visc}}}{kT} \right\}$$

El segundo término que implica  $G_{\text{visc}}$  es cada vez más importante a niveles de sobresaturación más altos, y después de que se alcance una temperatura de sobreenfriamiento crítica dependiente del sistema, hace que las velocidades de nucleación disminuyan debido a la difusión limitada por la viscosidad que impide la formación de nuevas superficies para las especies en nucleación. Al igual que con la termodinámica, los factores cinéticos también

exhiben interdependencias complejas y se limitan a ciertos regímenes del sistema, que colectivamente limitan la utilidad y la previsibilidad de los procedimientos de cristalización actuales.

5 Las mejoras tecnológicas de la nucleación y el crecimiento de los cristales deben ser compatibles con los procedimientos de producción y los procedimientos de cristalización existentes para su despliegue comercial. Un objetivo clave de la cristalización es la recuperación eficaz de un producto altamente purificado, y cualquier adición de modificadores para alterar el curso de la cristalización se debate de forma rigurosa y por lo general se ve desfavorecida por parte de los profesionales farmacéuticos y relacionados con los alimentos y sus autoridades reguladoras de supervisión. Con el fin de maximizar la utilidad y facilitar la adopción, generalmente se deben evitar las adiciones a un flujo de procedimiento y, cuando sea inevitable, los componentes agregados deben estar inmóviles con respecto al efluente del producto o recuperarse fácilmente mediante procedimientos físicos macroscópicos como se describe en la presente invención. El contacto de una solución sobresaturada con una superficie macroscópica para facilitar la nucleación primaria heterogénea racional es un enfoque interesante. La capacidad de controlar dicho procedimiento (es decir, la nucleación) se encuentra en el corazón del desarrollo de una nueva tecnología o microestructura. Esto se debe a que la nucleación controla en gran medida la estructura inicial, tipo, tamaño, escala y distribución espacial de las fases del producto.

20 La teoría de la nucleación en una superficie describe un mecanismo ordenado y gradual que implica la adsorción de solutos individuales en una superficie, la difusión de esos solutos a lo largo de la superficie y la nucleación que se produce posteriormente cuando los solutos unidos alcanzan el tamaño crítico dependiente del sistema que causa  $G_{cr}$  de la Ecuación 3 para tendencias negativas que favorecen el crecimiento espontáneo. Esta perspectiva mecanicista está demasiado simplificada e ignora el papel de la autoagregación de solutos, la adición de moléculas de solutos individuales a los agregados en solución, la coalescencia de los agregados y la adición de agregados a superficies heterogéneas en solución. Dado el régimen de concentración sobresaturada y la naturaleza fluxional de las estructuras de la solución, es factible que el procedimiento de nucleación pueda incluir procedimientos que deriven del comportamiento de solutos individuales, de agregados de solutos y de una combinación de estas especies en fase de solución. Las diferencias en el comportamiento químico y las propiedades físicas de las moléculas de soluto individuales y los agregados de estas especies están bien documentadas, y el papel subyacente de una superficie de nucleación se puede resumir para una discusión conveniente. Una superficie que facilita o inhibe la nucleación puede afectar la barrera de energía para la nucleación de varias maneras:

- 1 Proporcionando una red cristalina de plantilla estructuralmente similar a la de los procedimientos epitaxiales, incluyendo epitaxia en fase líquida
- 2 Estabilizando una estructura intermedia entre la de los agregados de soluto en solución y la estructura cristalina
- 35 3 Excluyendo o eliminando impurezas de disolventes de la estructura del agregado antes de la nucleación
- 4 Facilitando la formación de interacciones intermoleculares (o interatómicas) que estabilizan el agregado en crecimiento y la estructura cristalina.
- 5 Facilitando la coalescencia de los grupos de agregados de solutos adyacentes para lograr el tamaño crítico necesario para el crecimiento espontáneo.

40 Los tratados teóricos sobre nucleación heterogénea en un sustrato toman una perspectiva geométrica, con la premisa subyacente de que la geometría de la superficie del sustrato puede afectar al procedimiento de nucleación. Los límites extremos de esta teoría incluyen el modelo de superficie plana y el modelo esférico, estando representado el primero en la Figura 2. La descripción teórica de la nucleación en un sustrato plano proporciona un "núcleo de transformación" (Figura 2); es decir, un agregado de tamaño adecuado que  $G_{cr}$  presenta tendencias negativas que conducen a la nucleación. En este modelo de Turnbull, se produce la nucleación en una superficie para aquellos agregados en los que las dimensiones del sustrato son  $> 2r^*$  ( $r^*$  es el radio crítico para la nucleación) y para los que el radio del agregado es  $> 2r^* \sin \theta$ , como se muestra en la Figura 2.

50 Para migrar desde la superficie plana a un límite teórico diferente que comprende el sustrato esférico convexo que se muestra en la Figura 3, se puede derivar un nuevo término que implica el factor de forma  $f(m,x)$  para dar la Ecuación 6:

$$\text{Ec. 6 } f(m, x) = 1 + \left(\frac{1-mx}{g}\right)^3 + x^3 \left(2 - 3\left(\frac{x-m}{g}\right) + \left(\frac{x-m}{g}\right)^3\right) + 3mx^2 \left(\frac{x-m}{g} - 1\right)$$

55 La incorporación de este factor de forma  $f(m,x)$  a una ecuación para la energía libre de nucleación da el modelo de Fletcher de la Ecuación 7:

$$\text{Ec. 7 } \Delta G^* = 8\pi\sigma/3(\Delta G_v)^2 f(m, x)$$

60 El modelo de Fletcher predice que el factor de forma,  $f(m,x)$ , disminuye con el aumento del radio del sustrato, de modo que los sustratos esféricos grandes pueden proporcionar condiciones termodinámicamente más favorables

para la nucleación (es decir,  $f(m,x)$  disminuye y reduce la energía del sistema como se muestra en la Ecuación 7).

Desde una perspectiva energética, un evento de nucleación heterogéneo idealizado para una muestra líquida en forma de cubierta de una solución sobresaturada en un sustrato esférico o en un sustrato plano proporciona esencialmente requisitos de radio de agrupación idénticos. Más importante aún, la energía libre crítica requerida para la nucleación se reduce en un sustrato heterogéneo en comparación con la nucleación homogénea en solución, Ecuación 8:

$$\text{Ec. 8} \quad \Delta G_{\text{het}}^* = 1/2 \Delta G_{\text{hom}}^*$$

La importancia de la Ecuación 8 se puede apreciar al reconocer que un requisito de energía más bajo significa que la nucleación en una superficie heterogénea se puede producir a niveles más bajos de sobresaturación, y esta observación se ha atribuido históricamente a la presencia de "sustancias extrañas" en la solución sobresaturada. Dado el continuo de características superficiales entre plano, esférico y convexo, existen oportunidades útiles para mejorar los procedimientos de nucleación y se pueden diseñar una gran cantidad de materiales de sustrato para acomodar tales características, o las combinaciones de las mismas.

Para una gota líquida en una superficie, las fases sólida, líquida y gaseosa convergen para producir una línea interfacial trifásica como se muestra en la Figura 4. El ángulo de contacto macroscópico, definido como  $\sigma_l$  en la Figura 4, proporciona información importante relacionada con la humectabilidad del sustrato en contacto con la gota, y al minimizar la tensión de línea, se puede reducir la barrera energética global a la nucleación. El tema unificador en la discusión de la nucleación en las superficies es el efecto termodinámico favorable que una superficie de sustrato heterogénea puede tener sobre la coalescencia y el crecimiento agregados en una solución sobresaturada para dar un evento de nucleación.

La cinética de la nucleación en una superficie se puede describir utilizando una relación de Arrhenius modificada y, teniendo en cuenta las correcciones de tensión de línea, cualquier aumento en la tensión de línea acelerará la velocidad de nucleación en la superficie del sustrato y una disminución similar en la tensión de línea reducirá la velocidad global de nucleación inducida por el sustrato.

La relación inversa entre el efecto de la tensión de línea sobre la termodinámica de la nucleación (donde la disminución de la tensión de línea reduce la energía libre de la nucleación) y la cinética de nucleación (donde la disminución de la tensión de línea disminuye la velocidad de nucleación) es un punto importante. Esta relación generalizada también está de acuerdo con la regla de Ostwald que establece que el primer cristal obtenido rara vez es el producto termodinámicamente estable, sino que es el producto cinéticamente favorecido. Como tal, se debe establecer un equilibrio cuidadoso entre la nucleación y la termodinámica del crecimiento de los cristales, la cinética y los requisitos operativos de las actividades de producción.

La identificación y el aislamiento del material cristalino termodinámicamente estable es un objetivo comercial importante de la cristalización, y esto es particularmente cierto en los campos alimentario, farmacéutico, cosmético, agrícola, de química fina y de bioingeniería, altamente regulados. Para satisfacer estas necesidades, se necesitan nuevos procedimientos de nucleación para facilitar la formación y el aislamiento de las formas cristalinas termodinámicamente más estables lo antes posible en el procedimiento de desarrollo. Para este fin, se necesita cierta comprensión de la interdependencia entre la nucleación y el crecimiento de los cristales.

El crecimiento del cristal comienza inmediatamente después de que un agregado alcance el tamaño crítico necesario para la nucleación y la termodinámica de la retención de solutos se vuelve energéticamente favorable. Numerosas observaciones han indicado que los aspectos termodinámicos y cinéticos del crecimiento de los cristales se ven reforzados por las heterogeneidades de la superficie, denominadas colectivamente "rugosidad superficial" en el sustrato cristalino. Esta observación se puede racionalizar mecánicamente utilizando el efecto "vecino más cercano", en el que un aumento en las interacciones con especies adyacentes similares produce un efecto termodinámico favorable. Desde una perspectiva cinética, el aumento de la heterogeneidad superficial reduce las distancias de difusión superficial entre interacciones favorables y, de ese modo, se pueden observar mayores velocidades de nucleación y de crecimiento cristalino.

Después de que el agregado haya madurado a través de la nucleación hasta la fase de crecimiento del cristal, las teorías prevalecientes sugieren cuatro ubicaciones fundamentales, o heterogeneidades superficiales, en las que los solutos adsorbidos se pueden incorporar a un cristal en crecimiento: terrazas, escalones o caras de escalones, pliegues y dislocaciones de rosca. Estas cuatro características fundamentales se usan en las descripciones del crecimiento de cristales que se basan en mecanismos convenientes de adición de solutos, uno a la vez, que se obtienen al trabajar hacia atrás desde la estructura cristalina conocida para llegar a un mecanismo de crecimiento en solución. Para complicar aún más esta descripción gradual se produce el hecho de que las terrazas, escalones, pliegues y dislocaciones de rosca son transitorias: a medida que avanza el crecimiento (mediante cualquier mecanismo), las características son dinámicas en estructura y ubicación y no se deben ver desde una perspectiva

estática. Tal sesgo es involuntario, pero no obstante impone restricciones al mecanismo de nucleación y al crecimiento cristalino que no necesitan ser limitantes. La expansión de los mecanismos fundamentales para incluir el crecimiento de núcleos subcríticos y del crecimiento de cristales en sí mismo mediante la adición de agregados de solutos, así como el crecimiento de un soluto a la vez, puede crear nuevas opciones para mejorar los procedimientos de nucleación y crecimiento de cristales. Las diversas heterogeneidades dinámicas de la superficie descritas aquí pueden afectar a la energía superficial de un agregado de soluto en crecimiento como se muestra en las Ecuaciones 3, 7 y 8, y tales características de la superficie son importantes para diseñar nuevos enfoques para la nucleación y el crecimiento cristalino.

La mayoría de las discusiones presentan procedimientos por etapas para el crecimiento cristalino que incluyen la adsorción de un soluto sobre una superficie de cristal, la difusión del soluto a lo largo de una terraza y a continuación la incorporación al cristal en crecimiento en un sitio de heterogeneidad (es decir, una cara de un escalón, un pliegue o una dislocación de rosca) que aumenta las interacciones vecinas más cercanas y proporciona un entorno termodinámicamente favorable. Varios modelos intentan explicar la cinética del crecimiento de los cristales (por ejemplo, la teoría BCF) utilizando mecanismos conceptualmente directos, pero tales modelos son importantes solo para los cristales que crecen por deposición de vapor y, en casos muy raros, para la cristalización de soluciones a muy baja saturación donde la interfase cristal/solución es quiescente, y donde las interacciones soluto/disolvente son mínimas. Tales condiciones se encuentran con poca frecuencia en el laboratorio y muy raras veces a escala de procedimiento, lo que limita la aplicabilidad de dichos modelos.

Se ha desarrollado un mecanismo de difusión más ampliamente aplicable capaz de acomodar las condiciones de mezcla habituales de la cristalización a escala de laboratorio y de procedimiento. En contacto con la solución, un cristal en crecimiento crea un gradiente de concentración de soluto a medida que el soluto de interés se elimina de la solución y se incorpora al cristal (o agregado antes de la nucleación). La capa de solución en contacto con la superficie del cristal se agota progresivamente del soluto y se crea un gradiente de concentración con el resto de la solución. Esta región se conoce como la "capa límite de concentración" o más comúnmente la "capa de difusión superficial". Este gradiente de concentración y las propiedades fisicoquímicas de la capa de difusión superficial son la base del Modelo de capa de difusión, que generalmente es aplicable a los sistemas de cristalización a pequeña y gran escala que implican mezcla.

El Modelo de capa de difusión tiene en cuenta las diferentes alturas de la capa de difusión superficial en condiciones de mezcla variables, y la difusión de un soluto a granel a través de esta capa de difusión superficial es el paso limitante de la velocidad en este modelo. Se ha demostrado que la difusión de solutos en la capa de difusión superficial y la altura de la capa límite afectan a las velocidades de crecimiento cristalino. La capa de difusión superficial puede verse alternativamente como una capa de solutos agregados que rodean un cristal en crecimiento, y es esta capa, ya rica en solutos agregados, la que está involucrada en el procedimiento de reconocimiento.

Dos características físicas importantes derivadas de la cinética del crecimiento cristalino son la distribución del tamaño de partícula y la morfología del cristal. Debido a que hay un componente de área superficial en la disolución de sólidos, el tamaño y la forma de los materiales cristalinos que se disuelven se controlan cuidadosamente en uso comercial y son propiedades intensamente reguladas para un API. Por ejemplo, el tamaño y la morfología de los cristales son importantes en aplicaciones relacionadas con los alimentos en las que la sensación en la boca puede ser una medida de éxito, en cosméticos en las que la sensación en la piel o las propiedades de exfoliación son deseables, y en productos agrícolas en los que la disolución dependiente del tiempo puede ser ventajosa. Dado que el crecimiento de los cristales depende de la nucleación, está bien establecido que el procedimiento de nucleación y las condiciones de nucleación pueden afectar drásticamente a la distribución y la morfología del tamaño de los cristales: propiedades de la etapa de crecimiento de los cristales que son importantes para el uso final. Reconociendo la importancia de esta interdependencia, las nuevas técnicas de nucleación deben tener en cuenta los cambios en el crecimiento de los cristales que finalmente pueden afectar a las propiedades del uso final.

Cuando la cristalización se describe como un "procedimiento de reconocimiento molecular", se imponen restricciones severas a las nuevas técnicas debido a la diversidad química de los solutos para los que la cristalización es el procedimiento preferente de separación, purificación, recuperación o cualquier combinación de los mismos. La amplia gama de sólidos compuestos por átomos, iones, moléculas pequeñas, macromoléculas biológicas o sus combinaciones representa un enorme desafío para la utilidad de los nuevos procedimientos de nucleación, ya que es probable que no exista un procedimiento de nucleación único que sea universalmente válido a través de tales especies químicas diversas. Esta diversidad química y la falta general de herramientas adecuadas para inducir, inhibir o controlar de manera racional la nucleación explican el predominio de los enfoques actuales basados empíricamente para el análisis sistemático en forma sólida que dependen en gran medida de la experimentación de ensayo y error, la química combinatoria y cada vez más en la combinación de procedimientos de detección de alto rendimiento.

Los procedimientos epitaxiales se han promovido durante mucho tiempo como herramientas para la cristalización racional; sin embargo, existen problemas fundamentales subyacentes a los procedimientos epitaxiales que limitan su utilidad con respecto a las nuevas entidades químicas. La epitaxia implica un mecanismo de nucleación secundario que se basa en una superficie cristalina previamente formada para soportar el crecimiento del cristal.

Desafortunadamente, la estructura de una superficie epitaxial dada puede no ser una coincidencia estructural o energética apropiada para una nueva entidad química y saber qué superficie epitaxial emplear cuando se intenta cristalizar una nueva entidad química es actualmente incognoscible. Tales desajustes estructurales y energéticos podrían suprimir por completo la cristalización, o podrían conducir al aislamiento de un producto controlado cinéticamente en lugar del cristal preferido termodinámicamente estable.

En términos energéticos, las superficies epitaxiales presentan a una solución sobresaturada una cara de cristal que tiene una energía superficial estrechamente definida, y ese régimen energético puede no ser una combinación adecuada para facilitar la cristalización a partir de la solución. En teoría, la superficie epitaxial está destinada a servir como factor de reconocimiento y ensamblaje para el sistema objetivo, pero el comportamiento desconocido de la solución y la estructura desconocida de estado sólido de una nueva entidad química se combinan para hacer imposible seleccionar una superficie epitaxial adecuada *a priori*. Esta limitación fundamental combinada con la diversidad en los comportamientos químicos para los que la cristalización es importante limita severamente la utilidad de los procedimientos epitaxiales en las actividades de descubrimiento químico.

Teniendo en cuenta los desafíos impuestos por la diversidad de sustancias químicas de las especies que se cristalizan, la presente invención facilita la coalescencia de solutos y agregados de solutos para mejorar la nucleación utilizando superficies que pueden presentar un conjunto comparativamente diverso de energías superficiales. Esta estrategia deja los procedimientos de reconocimiento y ensamblaje de importancia crítica para los solutos respectivos y sus agregados, en lugar de tratar de sustituir el reconocimiento y el ensamblaje con una red cristalina preexistente como es el objetivo de la epitaxia y sus derivados. El enfoque de la presente invención está en consonancia con las observaciones de que el reconocimiento se produce en la superficie del agregado de soluto antes de la nucleación y en la capa de difusión de la superficie del soluto agregado del Modelo de capa de difusión de un cristal en crecimiento. En lugar de pasar por alto el procedimiento de reconocimiento y ensamblaje de una nueva entidad química y forzarla a un régimen estrictamente energético descrito por una red cristalina epitaxial existente, la presente invención utiliza una superficie amorfa con características superficiales modificadas de forma adecuada para presentar un espectro de energía a solutos y agregados de soluto en una solución sobresaturada para facilitar la fusión, el crecimiento y la nucleación de los agregados. Se logra una amplia utilidad no al superar los procedimientos de reconocimiento importantes para la nucleación y el crecimiento cristalino, sino al dejar estos procedimientos a los solutos y sus agregados, y al hacerlo, se mejora la probabilidad general de aislar las formas cristalinas termodinámicamente estables de las nuevas entidades químicas.

El emparejamiento de la energía superficial del soluto y los agregados de soluto en una interfase con un sustrato heterogéneo presenta los mejores medios para mejorar los procedimientos de nucleación mientras se mantiene la utilidad en diversas especies químicas.

La cristalización es importante en numerosas actividades comerciales, que abarcan desde la investigación y el desarrollo hasta la producción en las industrias alimentaria, cosmética farmacéutica, agrícola, de química fina y de bioingeniería. Como procedimiento, la cristalización se valora por su fiabilidad en términos de producción escalable y comportamiento consistente del producto de uso final, y de estos factores proviene una rentabilidad predecible. La variación de la forma sólida en todas sus formas (Figura 1), y en particular el polimorfismo, presenta desafíos importantes para la investigación y el desarrollo y las cristalizaciones a escala de procedimiento, y la consiguiente falta de previsibilidad introducida por la variación de la forma sólida puede tener consecuencias muy costosas como lo demuestra el problema del polimorfismo farmacéutico del Ritonavir de Abbott. Las consecuencias de la variación de la forma sólida y la nucleación primaria heterogénea inducida por contaminantes reducen la previsibilidad de un procedimiento de cristalización y posteriormente pueden reducir o eliminar las ventajas tecnológicas y comerciales. De las dos etapas de cristalización, la nucleación representa la mejor oportunidad para influir de forma racional en los resultados, ya que los agregados de solutos fluxionales pueden estar racionalmente predispuestos a la nucleación utilizando sustratos heterogéneos amorfos con modificaciones de energía superficial sometidas a ingeniería que no afectan negativamente a los procedimientos de reconocimiento y ensamblaje que son vitales para la nucleación y el crecimiento cristalino.

Como se discute en el presente documento, una reducción en la energía libre de nucleación en una superficie heterogénea es ventajosa en comparación con la nucleación homogénea. El uso de una superficie heterogénea brinda una oportunidad para el diseño racional de nuevos sistemas de nucleación y para el control racional de la nucleación y el posterior paso del crecimiento cristalino. Se pueden imaginar superficies heterogéneas sometidas a ingeniería con diversas características que impartan diferentes energías superficiales.

Las teorías contemporáneas y los intentos de diseño de cristales se basan con frecuencia en procedimientos epitaxiales que se basan en el uso de una plantilla cristalina para imponer el orden de los solutos objetivo en la interfase con la solución sobresaturada. En la teoría y en la práctica, la plantilla epitaxial puede estar o no estar químicamente relacionada con el soluto objetivo. En términos de mecanismos de nucleación, las estrategias actuales para el diseño de cristales se basan en la nucleación secundaria donde se usa una plantilla cristalina químicamente relacionada como una superficie sobre la que se adsorben los solutos individuales y se ensamblan bajo la influencia energética de la red cristalina subyacente. Tales procedimientos se han demostrado para sistemas seleccionados en el laboratorio y ven uso comercial en la fabricación de productos electrónicos, en los que la cristalización en fase de

vapor es una práctica común. El amplio uso de dicho crecimiento de estilo epitaxial para la cristalización a partir de la solución continúa representando numerosos desafíos, y se han discutido en el presente documento las limitaciones de la nucleación secundaria que se aplican a la investigación de la fase de descubrimiento que involucra nuevas entidades químicas.

5 Para que sea útil, una plantilla epitaxial debe presentar una superficie energéticamente favorable al soluto y los agregados respectivos de manera que haya una coincidencia estrecha entre la energía reticular de la plantilla epitaxial y la energía superficial de los solutos agregados. Más específicamente, debe haber una coincidencia estrecha entre la energía de unión,  $E_{att}$ , de la superficie epitaxial y la energía superficial del agregado de soluto

10 objetivo, como se define en la Ecuación 9:

$$\text{Ec. 9 } E_{latt} = E_{sl} + E_{att}$$

donde:

15

$E_{latt}$  = energía reticular del cristal

$E_{sl}$  = energía de corte para el ensamblaje de un corte o fragmento del cristal

$E_{att}$  = energía de unión liberada cuando un corte se une al cristal en crecimiento.

20 Para una forma cristalina dada de un soluto arbitrario,  $E_{latt}$  es una constante y  $E_{sl}$  es característica de la agregación de dicho soluto para formar un "corte" (es decir, una superficie de agregado) en una solución dada bajo un conjunto dado de condiciones. De ese modo, la Ecuación 9 indica que la energía de unión para un soluto arbitrario,  $E_{att}$ , es un valor estrechamente definido y que una plantilla epitaxial debe tener una energía casi equivalente a  $E_{att}$  para exhibir una ventaja energética. Esta ventana de energía estrecha se ve respaldada por la discusión anterior de la nucleación primaria heterogénea en la que una superficie contaminante se debe parecer mucho en tamaño y estructura al soluto objetivo con una disparidad de no más de un 15 % para que haya una ventaja energética en el procedimiento de nucleación. Para la mayoría de los proyectos de investigación y desarrollo que implican nuevas entidades químicas, la energía reticular no se conoce empíricamente, y las energías de corte y unión también se desconocen; de ese modo, las capacidades predictivas para identificar plantillas de superficie epitaxial adecuadas siguen siendo limitadas.

30

Se han discutido numerosas razones para la falta de una amplia aplicación de los procedimientos epitaxiales, pero un obstáculo fundamental es el desajuste energético entre la superficie de la plantilla epitaxial cristalina y la  $E_{att}$  de la superficie del agregado de soluto objetivo. La red cristalina presentada por una plantilla epitaxial está ajustada energéticamente para una clase de compuestos de forma tan estrecha que su utilidad se ve reducida en la misma medida. De ese modo, se necesitan nuevos procedimientos que se puedan ajustar a medida más ampliamente a la  $E_{att}$  de diversas clases de especies químicas, incluyendo, entre otras, átomos, iones y moléculas de uso en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, agrícola, de química fina y de bioingeniería.

35

40 La presente invención utiliza sustratos heterogéneos amorfos modificados de forma racional con sitios de nucleación superficiales que varían con respecto a la densidad del sitio de nucleación, orientación espacial, forma, tamaño, altura y las combinaciones de los mismos, para mejorar la termodinámica, cinética, pureza, morfología, distribución del tamaño de los cristales, facilidad de procesamiento o economía de los procedimientos de cristalización a partir de soluciones. Al centrarse en las propiedades energéticas superficiales de los solutos y sus agregados en una solución sobresaturada y con un ajuste juicioso del espectro de energía superficial mediante la elección de materiales de sustrato amorfos, las configuraciones del sitio de nucleación y los procedimientos de fabricación, la presente invención es ampliamente aplicable a una amplia gama de solutos que se podrían encontrar en usos alimentarios, farmacéuticos, cosméticos, agrícolas, de química fina y de bioingeniería. El carácter amorfo, la resistencia a la disolución, la durabilidad y la naturaleza comercial de las superficies de sustrato amorfos preferidas superan los desafíos que enfrentan los procedimientos de nucleación secundaria basados en epitaxia en la cristalización de soluciones. Además, se puede introducir cierto grado de variación espacial en la matriz de sitios de nucleación del sustrato heterogéneo amorfo, de un modo tal que la energía de la superficie pueda acomodar los factores energéticos de un sistema químico dado en lugar de forzar un motivo estructural y energético rígido preexistente (es decir, una red cristalina) en un sistema de comportamiento conocido o desconocido. Este enfoque racional para mejorar la termodinámica y la cinética de la nucleación que usan superficies de energía ajustadas a medida que comprenden sustratos amorfos y la utilidad resultante en la predisposición de agregados de solutos a la nucleación y el crecimiento de cristales es un enfoque novedoso para mejorar la cristalización y las propiedades asociadas, que incluyen, entre otras, morfología, distribución de tamaño cristalino, facilidad de procesamiento, manejo y economía de procedimiento.

60

Los materiales amorfos modificados de forma adecuada son prometedores como sustratos de nucleación por numerosas razones que incluyen factores energéticos, químicos, de producción y económicos. La importancia de la energía superficial ya se ha discutido en el presente documento, al igual que las limitaciones de los procedimientos de nucleación epitaxiales y otros procedimientos de nucleación secundaria que se basan en la unión a la superficie y valores estrechamente definidos de  $E_{att}$ . Los materiales amorfos, por definición, carecen de un orden de largo

65

alcanza y, de ese modo, no tienen energías de unión definidas estrechamente; por lo tanto, los materiales amorfos no imponen un régimen energético estrecho a una nueva entidad química que puede estar buscando un estado diferente de menor energía durante los procedimientos de nucleación, crecimiento cristalino o cambio de fase. Al usar sustratos amorfos modificados para presentar un espectro de energía (diseñado de forma adecuada para intervalos estrechos o amplios), se permite que el valor de  $E_{att}$  varíe con la nueva entidad química, mejorando de ese modo la probabilidad de lograr una coincidencia para  $E_{att}$  que sea representativa de la forma cristalina termodinámicamente favorable para la nueva entidad química.

Los materiales amorfos se adaptan muy bien a las modificaciones superficiales para alterar y mejorar una diversidad de características físicas, incluyendo la humectabilidad y los ángulos de contacto con la superficie. La humectabilidad y el ángulo de contacto están relacionados de forma más precisa con la energía superficial, y se ha demostrado que la termodinámica y la cinética del procedimiento de nucleación dependen de las interacciones de la energía superficial.

El examen de las distribuciones de entalpía y las funciones de probabilidad para varios sólidos muestra que las superficies amorfas (silicio en este caso) tienen mayores probabilidades de nucleación, como se muestra gráficamente en la Figura 5. El lado izquierdo de la Figura 5 muestra picos sombreados estrechos que representan las funciones de probabilidad de nucleación para las características de curvatura y crecimiento en terraza de sólidos cristalinos. Estos picos representan gráficamente el intervalo estrecho de valores de energía para  $E_{att}$  para una superficie cristalina, y es este espectro de energía estrecho el que limita la utilidad general de los procedimientos de nucleación secundaria, que incluyen técnicas de tipo epitaxial. A la derecha de la Figura 5, los materiales amorfos exhiben perfiles de probabilidad de nucleación más amplios, y el intervalo de energía más amplio representado por la región sombreada cubre un área más grande del perfil de entalpía y, de ese modo, las superficies amorfas proporcionan una mayor probabilidad de iniciar eventos de nucleación. La manipulación racional de las características superficiales de los materiales amorfos para crear un espectro de energía de superficie adecuadamente amplio para mejorar la probabilidad de coalescencia de solutos y agregados en una solución sobresaturada para mejorar la termodinámica, cinética o ambas, es un aspecto importante de la presente invención.

Los sustratos amorfos se adaptan bien a la modificación de la energía superficial y pueden verse afectadas propiedades físicas importantes. Una característica superficial importante para las interacciones interfaciales entre la solución sobresaturada y el sustrato es la humectabilidad superficial. El papel de la humectabilidad en la nucleación no se entiende bien, ya que algunas especies químicas pueden interactuar fuertemente con un sustrato como parte del procedimiento de nucleación, mientras que otras pueden exhibir un comportamiento itinerante. La naturaleza dinámica de los procedimientos de agregación, reconocimiento, ensamblaje, nucleación y crecimiento de cristales aún no se ha reflejado completamente en las descripciones mecanicistas de los procedimientos subyacentes, en los que una interacción débil y de corta duración puede ser adecuada para superar la barrera energética superficial del estado metaestable para inducir la nucleación y aliviar la condición sobresaturada.

Extendiéndose más allá de la humectabilidad superficial, la tensión de la línea trifásica (Figura 4) también se puede alterar ajustando la energía superficial de un material amorfo. El papel de la tensión de línea en la nucleación aún no es útil como capacidad predictiva e intentar optimizar las condiciones de cristalización utilizando solo las tensiones de línea sigue representando un desafío en el momento de la escritura.

Se pueden introducir varias características superficiales en un sustrato amorfo para alterar la energía superficial, y estas incluyen:

- 1 Densidad del sitio de nucleación
- 2 Orientación espacial del sitio de nucleación
- 3 Tamaño del sitio de nucleación
- 4 Forma de tamaño de nucleación
- 5 Canales
- 6 Superficies cóncavas
- 7 Superficies convexas.

Se pueden imaginar otras heterogeneidades superficiales diversas de utilidad para mejorar la nucleación por parte de los expertos en la materia.

La densidad superficial de los sitios de nucleación es una modificación superficial importante y controlada convenientemente, ya que el espaciado bidimensional uniforme de los sitios de nucleación en un sustrato heterogéneo amorfo puede alterar de forma drástica las interacciones superficiales con la solución, el soluto y los agregados de soluto. Basándose en las teorías de crecimiento de cristales, se ha sugerido que una superficie más heterogénea también puede ser beneficiosa en los procedimientos de nucleación. En el otro extremo, una reducción drástica de la densidad del sitio de nucleación posicionaría los sitios de nucleación de manera tan remota que se minimizarían las interacciones con los agregados adyacentes y los solutos adsorbidos. En este extremo, se vería disminuida la ventaja termodinámica derivada de la proximidad de los solutos y agregados de solutos.

En el continuo de densidades del sitio de nucleación entre los extremos muy alto y muy bajo, hay densidades que pueden acomodar diversas energías del sistema que derivan de la química de solutos, las características de agregación de solutos, las propiedades fisicoquímicas de la solución supersaturada contemplada, la  $E_{att}$  del soluto objetivo, y similares. Al variar de forma adecuada la energía superficial de los materiales amorfos mediante el uso de la variación del motivo de la superficie, se puede lograr una nucleación heterogénea mejorada.

Numerosos medios permiten la modificación de la superficie de materiales amorfos para facilitar la nucleación primaria heterogénea, y estos incluyen los procedimientos manuales, mecánicos o químicos convencionales de grabado y grabado al aguafuerte, incluyendo láser, plasma y otros procedimientos de deposición de energía. Se usan diversos procedimientos litográficos, de estampado, de marcado y de impresión aditiva para la deposición de motivos, y también serán de utilidad muchas técnicas de modificación superficial derivadas de la nanotecnología, como reconocerán los expertos en la materia.

De forma más específica, la presente invención contempla interacciones diseñadas de forma racional entre sustratos amorfos modificados de forma adecuada con agregados de soluto en una solución sobresaturada para promover la nucleación primaria heterogénea. Al reconocer los beneficios de la heterogeneidad de la superficie en la nucleación y el crecimiento de cristales (por ejemplo, los mecanismos de crecimiento en escalón, pliegue, y giro), se puede usar un sustrato amorfo que presente energías superficiales diseñadas de forma adecuada para influir en los procedimientos de nucleación. Debido a que la reproducibilidad es un aspecto importante de las actividades de investigación, desarrollo y producción, las superficies amorfas que se contemplan en el presente documento se pueden modificar de manera consistente utilizando procedimientos de fabricación controlados numéricamente por computadora. De esta manera, se puede fabricar de forma consistente una modificación adecuada que proporcione un intervalo específico de energías superficiales para proporcionar beneficios reproducibles a un sistema de cristalización de interés. Las características que proporcionan un intervalo específico de energías superficiales para un sustrato heterogéneo pueden comprender matrices de crestas, canales, escalones, pliegues, terrazas y similares, o cualquier combinación de los mismos, capaces de mejorar la fusión y el crecimiento de solutos y agregados de soluto de diferentes características químicas y propiedades físicas, incluyendo diferentes tamaños o formas. La variabilidad de tamaño y forma que ofrecen las matrices para la modificación de la energía superficial de la presente invención es otra característica clave de diferenciación, ya que el estado actual de la técnica se basa principalmente en procedimientos de inspiración epitaxial con plantillas rígidas y energías reticulares estrechamente definidas ( $E_{latt}$ ). Al crear un medio para mejorar la agregación de solutos y predisponer estos agregados de solutos a la coalescencia secundaria (es decir, la agregación de agregados) para facilitar el crecimiento hasta el tamaño crítico necesario para la nucleación, la presente invención se puede usar para efectuar de forma racional mejoras en la termodinámica de nucleación, cinética de nucleación, termodinámica de crecimiento cristalino, cinética de crecimiento cristalino, morfología cristalina, distribución del tamaño de cristal, facilidad de procesamiento, aislamiento de formas cristalinas termodinámicamente favorables, y similares.

La capacidad de crear de manera conveniente, rentable y reproducible sustratos amorfos heterogéneos con diferentes energías superficiales utilizando medios químicos, espectroscópicos, de radiación, térmicos o litográficos, o mediante fusión, estampado, marcado, impresión aditiva u otros procedimientos de fabricación puestos en práctica por los expertos en la materia, es una ventaja importante que respalda la amplia utilidad de la presente invención. La amplia variación en la funcionalización superficial y, por lo tanto, en las energías superficiales, proporciona un medio para ajustar a medida la energía de la superficie del sustrato para que coincida de forma adecuada con la energía preferida por un soluto dado en una solución sobresaturada. Al proporcionar una superficie de sustrato con un intervalo de energía ventajoso, hay una mayor probabilidad de obtener una coincidencia entre la energía de unión del soluto ( $E_{att}$ ) y la energía superficial de la superficie del sustrato. Es este intervalo de energías, o ventana energética, el que expande la utilidad de la presente invención mucho más allá de la energía y la utilidad estrechamente definidas de los procedimientos de nucleación secundaria, incluyendo el caso específico de la epitaxia en fase líquida.

Además de la variación espacial de los sitios de nucleación, ya estén presentes en forma de crestas, canales o similares, como se puede contemplar, cierto grado de variación de orientación permitirá el alojamiento de agregados de diferente tamaño, forma o identidad química. Esta variabilidad posicional afecta a la energía superficial de un sustrato amorfo dado y proporciona otro medio para acomodar la energía del soluto y del sistema sin imponer un régimen energético estrecho definido por una red cristalina preexistente.

Se anticipa que las características de la superficie del sustrato heterogéneo pueden contener bordes y características comparativamente definidos (por ejemplo, almenas) como se podrían encontrar en una superficie cristalina en crecimiento que tiene ángulos y morfología reticulares definidos, o bordes redondeados (por ejemplo, depresiones) que podrían ser más acomodativos de agregados en una solución, o las combinaciones de los mismos, que podrían ser ventajosos para un sistema dado. En cualquier caso, es el efecto neto de una modificación de la energía superficial y el impacto de este cambio de energía en el procedimiento de nucleación el que es un aspecto importante de la presente invención.

La presente invención emplea un sustrato como soporte físico rentable que es resistente a la disolución durante su uso. Algunos sustratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno,

poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno, vinilbenceno, los copolímeros de los materiales mencionados anteriormente, vidrio y otros materiales amorfos que pueden utilizar los expertos en la materia. Esta lista incluye, y se selecciona entre, materiales que generalmente son resistentes a la reacción química en las soluciones tradicionales de laboratorio y de escala de producción a partir de las que se puede llevar a cabo la cristalización.

5 Estos materiales se pueden emplear como una masa, como capas superficiales adheridas a otra superficie, y en otras combinaciones que puedan ser ventajosas para afectar de forma positiva a la nucleación, el crecimiento cristalino, o ambos.

10 La invención sujeto se puede utilizar en cualquiera de los siguientes formatos, y estos se presentan a modo de ejemplo. Los sustratos heterogéneos amorfos se pueden usar en forma de un recipiente de contención, en forma de una superficie en contacto con una solución que está o se vuelve sobresaturada, mediante un módulo adherido o incorporado a una pared del recipiente, o en forma de un módulo suspendido o que flota libremente debajo, en o en contacto intermitente con una interfase sólida, líquida o gaseosa de una solución. De forma más específica, la interfase mencionada anteriormente con una solución puede incluir cualquiera de los siguientes, solas o en combinación: una interfase aire/líquido, una interfase gas/líquido, una interfase sólido/líquido y otra interfase líquido/líquido. El sustrato heterogéneo amorfo se puede seleccionar entre una clase de polímeros orgánicos, copolímeros o materiales inorgánicos amorfos que por lo general son químicamente resistentes a la disolución o pasivación por una solución sobresaturada contemplada de un modo tal que se minimicen los equilibrios de disolución y los contaminantes que puedan interferir con los procedimientos de nucleación y crecimiento cristalino.

20 Los sustratos heterogéneos amorfos representan por lo general materiales básicos fácilmente disponibles a bajo coste y tienen propiedades de durabilidad, flexibilidad y resistencia a la disolución. Como material amorfo, se elimina la probabilidad de que las fuerzas de cizalladura del sistema provoquen una fractura del sustrato que conduzca a un cambio de un procedimiento de nucleación primaria heterogénea a uno de nucleación secundaria, ya que los materiales del sustrato en contacto con la solución no son cristalinos. Estas características superan muchas de las desventajas encontradas por el crecimiento de estilo epitaxial a partir de soluciones y otros sistemas en los que están implicados mecanismos de nucleación secundarios.

30 También se pueden seleccionar materiales particularmente preferentes entre la clase de materiales amorfos que son térmicamente estables con respecto a los cambios de temperatura. Dados los efectos bien establecidos de la temperatura en S (Ecuación 1), como se describe en el presente documento, es ventajoso usar simultáneamente las superficies de nucleación modificadas de la presente invención con un medio para disminuir, elevar o alternativamente ciclar la temperatura de un sistema para el que se desea la nucleación y el crecimiento cristalino. El efecto neto de la modulación de la temperatura podría ser un cambio masivo a la temperatura de la solución, o podría ser una perturbación térmica en un microdominio de la solución. Dado que la sobresaturación es una condición de no equilibrio y los efectos de los cambios de temperatura del microdominio en la nucleación y el crecimiento de los cristales no se comprenden completamente, una perturbación térmica menor en proximidad a una superficie de nucleación modificada contemplada puede producir un valor de S y un régimen energético que supere de forma adecuada la barrera de activación de la nucleación para un sistema de soluto dado. Los procedimientos para cambiar la temperatura de un sistema, ya sea en el dominio macroscópico o microscópico, se conocen bien en la técnica, e incluyen, entre otros, recipientes con camisa de fluido, elementos calefactores, dedos fríos, refrigerantes en recirculación, fluidos calientes en recirculación, dispositivos termoeléctricos, sólidos y líquidos criogénicos, y similares, como se pueden contemplar.

45 Se pueden obtener materiales de sustrato amorfo adicionales particularmente preferentes a partir de la clase de polímeros o materiales inorgánicos amorfos biocompatibles, y tales materiales son importantes en aplicaciones de bioingeniería. Por ejemplo, la hidroxiapatita es el componente principal de los huesos y los dientes y se formula como  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . El procedimiento por el que la hidroxiapatita se deposita en los sistemas biológicos se denomina biomineralización, y el mecanismo implica la nucleación heterogénea y el posterior crecimiento cristalino de la hidroxiapatita en superficies biológicas energéticamente favorables. El procedimiento de fijación e integración del implante en los tejidos circundantes se conoce como osteointegración, y es esencial para estimular tanto la función como la longevidad del implante. La incorporación (por ejemplo, a través de revestimiento u otras técnicas) de hidroxiapatita a la superficie de los materiales de implante diseñados puede ser beneficiosa para el procedimiento de osteointegración. Desafortunadamente, los intentos *ex vivo* en la nucleación y cristalización de hidroxiapatita usando condiciones *in vivo* (es decir, condiciones acuosas, presión atmosférica y temperatura fisiológica) dan como resultado cristales de tamaño nanométrico que son aproximadamente de 10 a 100 veces más pequeños que los de tamaño micrométrico que se obtienen en una biomineralización. Los cristales obtenidos *ex vivo* son de un tamaño tan pequeño que no logran impartir los atributos beneficiosos de los cristales de hidroxiapatita más grandes producidos *in vivo* a través de la biomineralización nativa. En vista de esta necesidad, las superficies modificadas de la presente invención son útiles en tales aplicaciones de bioingeniería dado que las superficies de nucleación de la presente invención son útiles para estimular el crecimiento de cristales de hidroxiapatita del tamaño apropiado.

65 Una ventaja importante de la modificación superficial de materiales amorfos para mejorar la nucleación heterogénea es que la probabilidad de formación de un agregado de tamaño apropiado para la nucleación mejora mediante el uso de un espectro de energía superficial comparativamente amplio en lugar del uso del espectro de energía cristalina característicamente estrecho de sustratos cristalinos, tal como se muestra en la Figura 5. El enfoque de la presente invención también deja intactos los procedimientos de reconocimiento químico y ensamblaje importantes para la

formación de agregados, el crecimiento de agregados, la nucleación y el crecimiento cristalino, en lugar de superar los procedimientos de reconocimiento y ensamblaje relacionados con la plantilla energética rígida de un sustrato cristalino que puede no ser una coincidencia termodinámica adecuada para el soluto objetivo.

- 5 Optimizando estratégicamente la energía superficial, el motivo y la densidad de los sitios de nucleación, se ha demostrado en la presente invención que se pueden reducir los efectos de la nucleación primaria heterogénea relacionada con contaminantes. La amplitud de los procedimientos y las instalaciones implicados en los modernos procedimientos de cristalización significa que las impurezas químicas y los contaminantes formados por partículas no se pueden eliminar por completo. La presente invención busca reducir estadísticamente la probabilidad y el impacto de estas infracciones de contaminantes optimizando la densidad del sitio de nucleación de una superficie heterogénea amorfa para un sistema de cristalización dado. Más generalmente, el predominio de la nucleación primaria heterogénea relacionada con contaminantes en las superficies de partículas de polvo y similares es atribuible a la barrera energética reducida a la nucleación presentada por la superficie contaminante. Tal nucleación inducida por contaminantes carece del comportamiento predecible que necesita una nueva herramienta tecnológica, y el uso de superficies amorfas modificadas con un espectro de energía de superficie ajustado a medida presenta un enfoque más predecible. Al reducir la barrera de activación para la nucleación de manera controlada utilizando sitios de nucleación modificados por ingeniería presentes en números que exceden al contaminante, se minimiza la probabilidad de nucleación inducida por contaminantes. Tal enfoque tendría un efecto favorable en la calidad, previsibilidad y economía del procedimiento.

20

### Ejemplos

Los presentes ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

- 25 La expresión "modificación superficial" que se usa en el presente documento se define para incluir cualquier cambio en el sustrato tal como mediante medios físicos, químicos u otros que puedan introducir una característica o características topográficas que den como resultado una perturbación de la energía superficial del sustrato cuando está en contacto con una solución. Se realizaron modificaciones superficiales en portaobjetos de microscopio de vidrio de cal sodada (portaobjetos de microscopio de Karter Scientific N/P 206A2, 1,0 + 0,2 mm de espesor, 30 limpiados previamente) con un sistema láser de CO<sub>2</sub> Trotec Speedy 300. Se prepararon plantillas de modificación superficial a modo de ejemplo usando el software CorelDraw X6 (Corel, Inc.) usando un ancho de línea de 0,35 puntos (25,4 mm / 72 puntos x 0,35 puntos ≈ 120 mm). La configuración del láser empleó una resolución de 1000 puntos por pulgada (ppp) y una velocidad del cabezal del láser de un 30 %.
- 35 Los motivos a modo de ejemplo para la modificación superficial se muestran en la Figura 6, y estos ejemplos están destinados únicamente a fines ilustrativos. Las superficies de Si amorfo con las modificaciones que se muestran en la Figura 6 se usaron en los ejemplos que se describen en el presente documento. Se fabricaron tres patrones de rejilla cuadrada con mesetas de 2,0 mm, 1,0 mm y 0,5 mm, al igual que una superficie que contenía una serie de círculos concéntricos. Los motivos etiquetados como Rejilla de 0,5 mm y Círculos de 0,5 mm se sometieron a ingeniería para tener relaciones de contacto comparables con una gota: de forma específica, la relación de contacto de área superficial de un pico con respecto a un valle se dirigió de forma arbitraria a una relación de aproximadamente 5,7. Esto se definió mediante la cuadrícula, y a continuación se consiguió para los círculos concéntricos por asignación de un ancho de línea idéntico y a continuación reducción del diámetro exterior del círculo inicial de 20 mm en aproximadamente un 8,75 % para cada círculo más pequeño. De esta manera, se podría 45 obtener una comparación directa entre los efectos de una rejilla almenada y las superficies circulares almenadas en una gota sésil, ya que las proporciones de área superficial meseta/valle son comparables a aproximadamente 5,7.

### Ejemplo 1: Mediciones del ángulo de contacto

- 50 Se utilizaron mediciones de ángulo de contacto (Lamour, G. and Hamraoui, A., Contact Angle Measurements Using a Simplified Experimental Setup. J. Chem. Educ. 2010, 87(12), 1403-1407) para evaluar los tratamientos superficiales en muchos campos, incluidos química superficial y biomateriales. Una comprensión de las propiedades macroscópicas de la energía superficial y la humectabilidad es útil para las superficies de nucleación modificadas y no modificadas que se utilizarán para la nucleación y el crecimiento cristalino. Los presentes inventores empleamos la técnica de caída sésil para la medición de ángulos de contacto, que se acepta generalmente como se describe en la bibliografía.

- Una gota de líquido puro en una superficie sólida plana experimenta fuerzas adhesivas que actúan entre el líquido y la superficie sólida que favorecen la dispersión, mientras que las fuerzas cohesivas dentro del líquido contrarrestan esta dispersión. Un sustrato con una energía superficial que es más alta que la tensión superficial de una gota de líquido sufrirá una humectación completa de modo que dominen las interacciones entre el líquido y el sustrato, lo que da como resultado un ángulo de contacto de 0°. Si el sustrato tiene una energía superficial intermedia inferior a la tensión superficial del líquido, el líquido humedecerá el sustrato y el ángulo de contacto estará en el intervalo de 0° < θ < 90°. Si el sustrato tiene una energía superficial que es sustancialmente menor que la de la tensión superficial de una gota de líquido, se dice que la superficie no se humedece (o se humedece poco), lo que da como resultado ángulos de contacto para el agua que exceden los 90°.

65

Los experimentos de ángulo de contacto que se describen a continuación se dirigen a una comprensión de los ángulos de contacto comparativos entre las superficies de sustrato modificadas y no modificadas. Debido a que las características de la superficie modificada son más grandes que las gotas sésiles que se utilizan en estas mediciones, se puede esperar un ángulo de contacto dinámico sin equilibrio debido a la caída de la gota sobre la superficie del sustrato. El protocolo experimental para la medición de ángulos de contacto para gotas sésiles se ha descrito en la bibliografía. El resumen, se colocan portaobjetos con diseño topográfico y sin diseño en un bloque de aluminio nivelado dentro de una cámara de luz fotográfica. A continuación se colocó una gota de 20 ml de H<sub>2</sub>O de una jeringa estanca a gases de 25 ml (Hamilton Modelo n.º 1702) directamente en el centro de cada una de las superficies modificadas o no modificadas (la última denominada en lo sucesivo control de superficie) que se muestran en la Figura 6, seguido de la adquisición de imágenes a través de una fotografía digital. Las mediciones del ángulo de contacto se llevaron a cabo a temperatura ambiente ( $\approx 20\text{ }^\circ\text{C}$ ). Para facilitar un contraste de imagen adecuado, la gota se iluminó con una luz de fondo usando una lámpara halógena de 50 W que brilló a través de un difusor de papel alojado dentro de la cámara de luz fotográfica. Los datos de la imagen fotográfica se recopilaron cada 15 minutos en el transcurso de 1 hora a través de una cámara monocular dedicada en un microscopio Amscope 3,5-90x Trinocular Zoom Stereo que utiliza una cámara digital Canon EOS Rebel T2i de 18 megapíxeles equipada con un adaptador de cámara Fotodiox D-SLR (2x aumentos). El microscopio y la cámara se colocaron a  $90^\circ$  de incidencia con respecto a la interfase de la superficie del sustrato con la gota sésil con la ayuda de un soporte telescópico 3D. El campo de visión se ajustó mediante aumento con el fin de lograr un tamaño de imagen adecuado para el procesamiento y fue aproximadamente de 4x a través de la lente de la cámara. Las imágenes fotográficas resultantes se analizaron a continuación con el software ImageJ (Versión 1.46, National Institutes of Health) utilizando el complemento de módulo de software de ángulo de contacto para determinar el ángulo de contacto para cada gota sésil. El ajuste de la curva del ángulo de contacto empleó selección manual de puntos junto con la función de "mejor ajuste" de curva elipsoide del software.

Como se muestra en la Tabla 1, las cuatro superficies modificadas muestran disminuciones constantes en el ángulo de contacto para las gotas sésiles de H<sub>2</sub>O en función del tiempo. A diferencia de las superficies modificadas de los portaobjetos, los ángulos de contacto para las gotas depositadas en el control de superficie exhibieron solo una ligera disminución en el ángulo de contacto ( $\approx 6^\circ$ ) en de los primeros 15 minutos de medición, después de lo cual los ángulos de contacto permanecieron esencialmente sin cambios para  $\theta \approx 15^\circ$ . Se observó una humectación completa (es decir,  $0, \approx 0^\circ$ ) para las modificaciones de la rejilla de 0,5 mm y 1,0 mm, lo que significa que las energías superficiales de estas modificaciones exceden la tensión superficial de la propia H<sub>2</sub>O, que es 72,8 mN/metro. Por inferencia, la superficie de la rejilla de 2,0 mm con un ángulo de contacto de  $3,6^\circ$  a 1 h tiene una energía superficial solo ligeramente inferior a la del agua, mientras que el motivo circular tiene la energía superficial más baja de las cuatro superficies modificadas y se puede estimar a partir de los ángulos de contacto a aproximadamente un 50 % de los del control de superficie.

**TABLA 1. Mediciones de ángulo de contacto dinámico en superficies de sustrato modificadas y no modificadas a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ .**

Modificación superficial	Rejilla de 0,5 mm	Rejilla de 1,0 mm	Rejilla de 2,0 mm	Círculos conc. de 0,5 mm	Control de superficie
Tiempo (h)	Ángulo de contacto	Ángulo de contacto	Ángulo de contacto	Ángulo de contacto	Ángulo de contacto
0,00	32,6	22,5	25,7	30,0	20,8
0,25	24,0	20,1	23,3	26,5	14,8
0,50	9,7	12,8	20,0	18,0	15,3
0,75	2,5	3,1	14,1	12,2	14,8
1,00	$\approx 0$	$\approx 0$	3,6	7,2	13,9
<b>Velocidad de cambio (grados/h)</b>	32,6	22,5	22,1	22,8	6,9

Durante y después del curso de experimentos de ángulo de contacto comparables a los que se describen aquí, se observó que las gotas de H<sub>2</sub>O permanecen relativamente adheridas a las superficies modificadas de manera que los sustratos podían inclinarse sin movimiento sustancial de la gota. Para los patrones de rejilla que exhiben la humectación más eficaz y los ángulos de contacto más bajos, los sustratos se pueden invertir por completo sin que la gota se mueva hacia un borde o salga de la superficie. Esta observación podría ser ventajosa, por ejemplo, en situaciones en las que se requiere invertir una gota de una solución sobresaturada (es decir, huang) para investigaciones analíticas, difusión de disolventes o crecimiento de cristales.

**Ejemplo 2: Pérdidas de masa por evaporación**

La evaporación es un procedimiento muy común para aumentar la concentración de soluto y S (la proporción de sobresaturación) para inducir la nucleación. La masa total de material está limitada con frecuencia en la fase de descubrimiento de una nueva entidad química, y es una práctica común que pequeños volúmenes de solución se evaporen lentamente de tubos de cultivo, viales y similares, con la tapa suelta, para aumentar de forma gradual la proporción de sobresaturación. (S, Ecuación 1) e inducir la cristalización. La gota colgante, y los procedimientos relacionados con la gota sésil, se usan a menudo en la cristalización de proteínas para la determinación de la estructura y son técnicas apreciadas por su capacidad para producir materiales cristalinos bien ordenados. Los procedimientos de gota colgante y sésil también pueden implicar la difusión en fase de vapor de un antisolvente (es decir, otro disolvente en el que el soluto objetivo es menos soluble) en la gota que contiene el soluto de interés para aumentar lentamente S y, de ese modo, inducir la nucleación. Los procedimientos de intercambio evaporativo y disolvente/antisolvente se ven fundamentalmente afectados por el tamaño de la gota, la forma de la gota, la solubilidad relativa del soluto y otros factores físicos que incluyen temperatura, ángulo de contacto con la superficie del sustrato y la energía superficial.

Con el fin de estudiar las velocidades de evaporación comparativas del solvente de las superficies modificadas y la superficie de control de la Figura 6, se usó una balanza analítica (Mettler Toledo, Modelo AX304) en una determinación basada en masa de la velocidad de evaporación. Las superficies que se examinaron se colocaron individualmente en la balanza analítica, se tararon y a continuación se colocó una gota de 20 µl de H<sub>2</sub>O en la superficie usando una jeringa de 25 µl. Las muestras se mantuvieron en reposo en la balanza y se tomaron medidas de masa a intervalos de 15 minutos.

Los datos que informan la velocidad de evaporación se presentan en la Tabla 2. Los resultados siguen por lo general los mismos patrones que las mediciones del ángulo de contacto; es decir, las mediciones de ángulo de contacto dinámico más pequeñas (Tabla 1) y la velocidad de evaporación son generalmente más rápidas con las modificaciones superficiales basadas en la rejilla. Las velocidades de evaporación para los círculos de 0,5 mm y el control de superficie tienen diferencias estadísticamente significativas (> 3 desviaciones estándar estimadas (esd)) de los motivos de rejilla y exhibieron las pérdidas de masa más lentas debido a la evaporación.

**TABLA 2. Pérdidas de masa por evaporación de superficies modificadas y de control a 20 °C.**

	<b>Rejilla de 0,5 mm</b>	<b>Rejilla de 1,0 mm</b>	<b>Rejilla de 2,0 mm</b>	<b>Círculos conc. de 0,5 mm</b>	<b>Control de superficie</b>
<b>Tiempo (h)</b>	Masa de la gota (mg)	Masa de la gota (mg)			
0,00	20,4(4)	21,5(2) <sup>a</sup>	19,8(2)	21,0(1)	20,4(2) <sup>a</sup>
0,020 (1 min)	20,0(3)	21,2(1)	19,6(2)	20,8(2)	20,2(2) <sup>a</sup>
0,25	16,4(6)	17,8(1)	16,4(2)	18,4(4)	17,8(5)
0,50	12,8(4)	14,2(1)	13,1(2)	15,9(6)	15,2(1)
0,75	9,2(5)	11,0(6)	9,8(2)	13,4(5)	12,4(1)
1,00	5,5(3)	7,6(6)	6,6(1)	10,8(6)	9,5(2)
<b>Velocidad de cambio (mg/h)</b>	14,9(5)	13,9(6)	13,2(2)	10,2(6)	10,9(3)

<sup>a</sup> No se llevaron a cabo experimentos por duplicado para estas mediciones. Las desviaciones estándar estimadas informadas son promedios calculados a partir de mediciones en el mismo incremento de tiempo (es decir, la misma fila). Estos datos se utilizan en los cálculos de la velocidad de cambio evaporativo.

Como se ha discutido en otra parte, el grado de propagación de la gota depende de la energía superficial del sólido y de la tensión superficial del líquido (Cazabat, A. M., Cohen-Stuart, M. A. J. Phys. Chem. 1986, 90, 5845-5849). Una gota dada se extiende, o alternativamente, disminuye su ángulo de contacto, de manera más eficaz en las superficies amorfas modificadas de la rejilla dado que la gota tiene un perfil de energía diferente y más grados de libertad con respecto al viaje a lo largo de canales que se cruzan. Debido a que la gota se aplanan y se hace más grande en las superficies modificadas de la cuadrícula, las características de la un gota cambian y la altura y el tamaño generales de la gota pueden conducir a una evaporación acelerada.

El control de superficie no tiene ningún canal y la gota de H<sub>2</sub>O permanece fija dado que la energía superficial del portaobjetos es menor que la viscosidad del agua. Los círculos de 0,5 mm presentan un híbrido interesante entre los motivos de rejilla y la superficie de control en que los grados de libertad son limitados ya que los canales que

comprenden los círculos concéntricos no están en contacto de flujo entre sí. Los ángulos de contacto a 1 h y la velocidad de cambio del ángulo de contacto dinámico para los círculos de 0,5 mm sugieren energías superficiales y un comportamiento evaporativo que se asemeja más a las superficies modificadas de la rejilla; sin embargo, los datos de evaporación y los errores propagados sugieren un parecido estadísticamente significativo más cercano a la superficie de control. La ausencia de comunicación de flujo entre los círculos concéntricos y los efectos poco conocidos del comportamiento de fijación hacen de este un hallazgo novedoso, ya que el control de las técnicas de evaporación y difusión de disolventes para ajustar  $S$  e inducir la nucleación y el crecimiento cristalino es de utilidad.

### Ejemplo 3: Densidad de sitios de nucleación y distribución del tamaño del cristal

Se preparó una solución acuosa de decahidrato de borato sódico de 100 mg/ml por adición de 24 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Henkel AG) a 240 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y calentando a continuación hasta ebullición para asegurar la disolución completa. La solución caliente se pasó a continuación a través de un filtro de papel y se dividió en alícuotas para su uso en experimentos de nucleación y cristalización.

Se llevaron a cabo seis experimentos que comprenden control de disolvente, control de superficie, rejilla de 2,0 mm, rejilla de 1,0 mm, rejilla de 0,5 mm y motivos circulares de 0,5 mm. Se añadieron aproximadamente 40 ml de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  acuoso caliente de 100 mg/ml a cada recipiente tapado y (cuando fue apropiado) se insertó una de las superficies de nucleación modificadas para que cualquier motivo se sumergiera completamente en la solución. Cada superficie de nucleación se orientó ligeramente hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 60-70° para evitar la acumulación de sólidos de cualquier cristalización en masa de la solución por la superficie de nucleación. Los recipientes se taparon inmediatamente y se dejaron enfriar a  $\approx 20^\circ$ . Después de  $\approx 0,5$  h, se formaron pequeños cristales de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  en todos los motivos sometidos a ingeniería que se muestran en la Figura 6, incluido el control de superficie. Se formó un cristal grande después de aproximadamente 3 h en el experimento de control de disolvente (es decir, sin superficie de nucleación añadida), y ninguna de las superficies de nucleación modificadas dio cristales comparativamente grandes hasta un tiempo de 24 h.

La Figura 7 muestra los resultados de los estudios de nucleación y cristalización de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , en los que la columna izquierda muestra el control de superficie y la columna derecha los materiales cristalinos que se formaron en las diversas superficies de nucleación modificadas, a pesar de su orientación hacia abajo. Esta observación sugiere que los eventos de nucleación para  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  se produjeron en o cerca de las superficies de nucleación, aunque el crecimiento de cristales en las superficies de nucleación objeto no es necesario para promover o inhibir la nucleación como se demostró en ejemplos posteriores. Las cuatro superficies de nucleación modificadas de la presente invención exhiben claramente un comportamiento diferente del control de superficie y diferentes entre sí. El motivo de Rejilla de 2,0 mm exhibe una gran distribución de tamaño de cristal, con sólidos que van desde pequeños microcristales a cristales más grandes de aproximadamente 4-5 mm de tamaño. En comparación, el motivo de Rejilla de 1,0 mm proporciona una distribución estrecha del tamaño del cristal con sólidos microcristalinos que cubren la mayoría de la superficie modificada y le confieren una apariencia opaca debido al reflejo de la luz de los múltiples cristales de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  en diferentes orientaciones.

La superficie de Rejilla de 0,5 mm da solo unos pocos cristales, con una distribución de tamaño de cristal similar a la de la Rejilla de 2,0 mm, pero con un recuento mucho menor de partículas (es decir, cristalino). La cobertura superficial de los materiales microcristalinos en los Círculos de 0,5 mm es bastante baja, y la distribución del tamaño del cristal para los círculos de 0,5 mm es similar a la Rejilla de 1,0 mm, a pesar de la ausencia de intersecciones de 90° en el primero.

El gran número de sólidos microcristalinos en el motivo de Rejilla de 1,0 mm en relación con todas las demás superficies sugiere una energía superficial favorable para la nucleación. De forma más específica, el gran número de sólidos microcristalinos en la superficie de la Rejilla de 1,0 mm refleja probablemente una alta densidad de sitios de nucleación energéticamente favorables. La Rejilla de 0,5 mm tiene el mayor número de características sometidas a ingeniería por unidad de área y, por lo tanto, la mayor densidad de sitios potenciales de nucleación sometidos a ingeniería; sin embargo, la Figura 7 muestra que los cristales obtenidos para la Rejilla de 0,5 mm se asemejan más a los tamaños, formas y distribución de tamaños obtenidos utilizando la Rejilla de 2,0 mm y las superficies de control. De ese modo, no es meramente el número de sitios de nucleación sometidos a ingeniería, sino que debe haber una coincidencia apropiada entre la energía superficial de la superficie de nucleación modificada y  $E_{\text{att}}$  (Ecuación 9) del soluto de interés.

Se pueden extraer varios puntos clave con respecto a la utilidad de la Figura 7; de forma específica, que el motivo de Rejilla de 1,0 mm es útil para formar cristales pequeños con una distribución estrecha del tamaño de cristal, lo que puede ser ventajoso para un procedimiento que requiera una disolución rápida en un período de tiempo reducido. Alternativamente, el motivo de Rejilla de 0,5 mm es útil si la nucleación y el crecimiento de cristales fueran menos deseables en una ubicación dada. Tal situación puede surgir en aplicaciones que involucren bioingeniería en las que las superficies implantadas pueden necesitar suprimir la biomineralización u osificación en ciertas áreas y estimularla en otras regiones del implante. La distribución comparativamente amplia del tamaño de cristal de la modificación superficial de la Rejilla de 2,0 mm podría ser útil en diversas circunstancias en las que encuentran utilidad partículas de diferentes tamaños y áreas de superficie, tal como en; por ejemplo, aditivos agrícolas o alimentarios en los que la

disolución prolongada de componentes minerales o edulcorantes, respectivamente, puede ser ventajosa.

#### Ejemplo 4: Cristalización por evaporación de ácido acetilsalicílico en superficies de nucleación

5 En un experimento de evaporación no confinada, se administraron 20 µl de una solución de 150 mg/ml de ácido acetilsalicílico en alcohol isopropílico al 91 % en una de las superficies de nucleación modificadas y en un control de superficie correspondiente. Cada solución se dejó evaporar a 20 °C. Después de la evaporación completa, los cristales resultantes se examinaron bajo un microscopio estereoscópico con aproximadamente 2 aumentos, como se muestra en la Figura 8. Los resultados muestran la nucleación y el crecimiento cristalino principalmente a lo largo y dentro de las características del motivo con relativamente menos cristales que se nuclean en las regiones superficiales no modificadas. El Círculo de 0,5 mm exhibió más cristales en forma de aguja a lo largo del motivo circular que las otras características sometidas a ingeniería. El patrón de Rejilla de 0,5 mm también tenía cristales en forma de aguja agrupados en las características con menos cristales finos en forma de aguja en la superficie prístina. El motivo de Rejilla de 1,0 mm dio cristales de ácido acetilsalicílico más cortos que los observados para los otros motivos. El control de la superficie proporcionó muchos puntos aleatorios de nucleación y los cristales de ácido acetilsalicílico tenían morfologías irregulares parecidas a un estallido estelar.

Las imágenes de la Figura 8, obtenidas mediante microscopía, proporcionan una visión de la concentración relativa de cristales, y por extensión de los sitios de nucleación, en las características de la modificación de la energía superficial. Estos datos demuestran la eficacia de las modificaciones de la energía superficial con respecto a la nucleación y el crecimiento cristalino, ya que el aumento de la densidad de partículas en las características del motivo es evidente y está bien organizado en comparación con las superficies inmediatamente adyacentes que no han sido sometidas a ingeniería para contener sitios de nucleación.

#### 25 Ejemplo 5: Recuento de partículas para cristales en superficies de nucleación modificadas

Los experimentos del Ejemplo 4 y la Figura 8 fueron investigados utilizando la función Analizar Partículas del Software ImageJ (Versión 1.46, National Institutes of Health). El software no pudo diferenciar con precisión entre las características del motivo y la gran cantidad de cristales de ácido acetilsalicílico en las características, por lo que los datos presentados aquí son para los recuentos de partículas en las regiones de meseta oscura de las superficies modificadas que se muestran en la Figura 8. En esencia, estos datos reflejan el efecto de los sitios de nucleación diseñados que compiten y reducen de forma eficaz los eventos de nucleación aleatorios de la superficie no modificada.

35 Como se muestra en la Tabla 3, el motivo de Círculo de 0,5 mm tuvo menos cristales de ácido acetilsalicílico presentes por unidad de área en la región no modificada que el resto de los motivos. La Rejilla de 2,0 mm también tuvo un número menor de cristales de ácido acetilsalicílico/mm<sup>2</sup> en promedio para el área superficial, pero esto es probable porque los cristales formados en este patrón son de mayor tamaño que los obtenidos para las otras superficies de nucleación. El patrón de Rejilla de 0,5 mm tiene la mayoría de los cristales en promedio para el área de superficie, pero esto se debe a una distribución de tamaño de cristal más pequeña para este motivo. La inspección visual de la Figura 8 proporciona evidencias claras de que se produce más nucleación y crecimiento cristalino en las modificaciones superficiales del motivo del Círculo de 0,5 mm que en cualquiera de las demás portaobjetos y el motivo de Rejilla de 2,0 mm tuvo el mayor crecimiento cristalino en las regiones cuadradas fuera de las características superficiales.

45

**TABLA 3. Recuentos de partículas a partir del software ImageJ para ácido acetilsalicílico en superficies de nucleación sometidas a ingeniería.**

	Rejilla de 0,5 mm	Rejilla de 1,0 mm	Rejilla de 2,0 mm	Círculos conc. de 0,5 mm
Área analizada	4 mm <sup>2</sup>	16 mm <sup>2</sup>	64 mm <sup>2</sup>	Cuatro círculos de 0,5 mm
Recuento de partículas	117(20)	150(51)	252(66)	43(34)
Partículas/mm <sup>2</sup>	29(5)	9(3)	4(1)	3(3)

#### 50 Ejemplo 6: Mediciones de tiempos de nucleación y cristalización para superficies modificadas y de control

Los estudios de tiempos de cristalización que usan ácido acetilsalicílico como sistema modelo son un estándar en la bibliografía científica para la caracterización de las propiedades de nucleación de nuevos materiales, y los datos presentados aquí siguieron un protocolo modificado localmente. Se preparó una solución de 150 mg/ml de ácido acetilsalicílico (Sigma Aldrich) en alcohol isopropílico al 91 % (v/v) (Aaron Industries, Inc.) combinando 37,5 g de ácido acetilsalicílico con 250 ml de alcohol isopropílico al 91 % y calentando a 60 °C en un recipiente cerrado herméticamente para facilitar la disolución. La solución transparente se dejó enfriar a ≈ 20 °C durante al menos 30 minutos antes de su uso y fue estable con respecto a la cristalización a temperatura ambiente.

55

Las superficies de nucleación modificadas y de control que se muestran en la Figura 6 se limpiaron antes de su uso enjuagando con alcohol isopropílico al 91 % y luego sumergiendo a 60 °C en alcohol isopropílico al 91 % durante aproximadamente 30 minutos, después de lo cual esta solución se desechó. Las superficies se empaparon posteriormente en H<sub>2</sub>O a 60 °C durante aproximadamente 30 minutos, se enjuagaron con H<sub>2</sub>O reciente y se secaron en posición vertical a 60 °C en un recipiente sin cubrir para minimizar la intrusión de polvo.

Debido a la naturaleza estocástica de la cristalización, son necesarias mediciones repetidas y un análisis estadístico es una parte importante de las conclusiones extraídas de los datos. Además, los factores ubicuos que pueden inducir la nucleación y afectar al crecimiento de los cristales, tales como impurezas, polvo y similares, requieren manipulaciones cuidadosas y un diseño cuidadoso de los experimentos de control. Los controles con disolventes (es decir, sin la presencia de superficie de nucleación) permiten la monitorización de las variables de la fase de solución; por ejemplo, impurezas, sólidos adventicios y fragmentos cristalinos microscópicos, que podrían inducir la nucleación primaria o secundaria y son necesarios para factorizar los eventos de nucleación que surgen de otras superficies que compiten con las superficies de nucleación sometidas a ingeniería de la presente invención. Los experimentos de control de superficie también son importantes, ya que las regiones no modificadas que rodean las modificaciones superficiales pueden afectar a los resultados de la nucleación y la cristalización. En estos estudios, los experimentos de control de superficie y control de disolvente fueron aleatorizados a través de diferentes soluciones para reducir el efecto de los errores aleatorios. Este enfoque que implica un control cuidadoso del manejo de la solución, controles de solventes, controles de superficie, duplicar experimentos y análisis estadísticos brinda la mayor probabilidad de descubrir hallazgos estadísticamente significativos y reproducibles.

Se llevaron a cabo experimentos de tiempo de cristalización en viales tapados de 120 ml a los que se habían añadido aproximadamente 40 ml de ácido acetilsalicílico 150 mg/ml en alcohol isopropílico al 91 %. Se insertó una de las superficies de nucleación en cada vial de manera que la superficie de nucleación modificada (si estuviera presente) se sumergió completamente en la solución. Cada superficie estaba orientada ligeramente hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 60-70° para que cualquier cristalización en masa de la solución no se acumulara en la superficie de nucleación. Los viales se enfriaron inmediatamente a 0 °C en un baño de hielo/H<sub>2</sub>O mantenido dentro de un refrigerador. Los viales se monitorizaron para detectar la aparición de material cristalino a intervalos de 15 minutos hasta los primeros 180 minutos, y con menor frecuencia a partir de entonces hasta 24 horas. El tiempo de inicio de la cristalización marcó el punto final para un experimento dado, y se llevaron a cabo un total de seis réplicas.

Los tiempos medios de cristalización con desviación estándar estimada (esd) para ácido acetilsalicílico en alcohol isopropílico al 91 % a 0 °C se informan en la Tabla 4.

**TABLA 4. Tiempos medios de cristalización (minutos) para ácido acetilsalicílico en alcohol isopropílico al 91 % a 0 °C para sistemas de control y superficies de nucleación modificadas.**

N = 6	Control de disolvente	Control de superficie	Rejilla de 0,5 mm	Rejilla de 1,0 mm	Rejilla de 2,0 mm	Círculos de 0,5 mm
Med	Ningún crist. hasta 242	118	40	65	45	60
esd	Ningún crist. hasta 242	91	11	33	27	34
<b>Med. Todas las superficies</b>		65				
<b>esd Todas las superficies</b>		28				
<b>Med. Superficies modificadas</b>		52				
<b>Superficies modificadas</b>		10				

El primer hallazgo clave es que ninguno de los experimentos de control de disolvente exhibió nucleación espontánea ni cristalización hasta un tiempo de 242 min, y muchos fueron estables durante más de 24 h. La falta de cristalización para estos experimentos de control de disolvente son indicaciones de estabilidad del sistema y el cuidado experimental para evitar polvo, caspa y partículas que pueden servir como superficies de nucleación adventicias. Para cada una de las superficies de nucleación modificadas y para la superficie de control, se observaron en primer lugar los cristales de ácido acetilsalicílico flotando en la interfase aire/solución y a continuación los cristales se depositaron frecuentemente a partir de la solución en el fondo del vial de reacción.

Los datos del control de superficie arrojan un tiempo promedio de cristalización de 118 min con una esd de 91 min: 118 (91) min. El control de superficie está "sin modificar", mientras que presenta a la solución de control una superficie masiva y unas características de los bordes que son comunes a todos los experimentos (excluyendo el control de solvente). El intervalo en tiempos de cristalización del control de superficie de 29,5-242,0 min da una gran

desviación estándar de 91 min, que es una representación estadística de la mala reproducibilidad en la cristalización para la superficie no modificada.

- 5 El promedio de los tiempos de cristalización para las cinco superficies, incluido el control de superficie, da un valor de 65 (28) min. Para determinar si las superficies sometidas a ingeniería están efectuando una reducción estadísticamente significativa de los tiempos de nucleación y cristalización, se toma el doble de la esd de 28 min para este promedio y se buscan tiempos de cristalización que sean diferentes en 2 esd para un nivel de confianza de un 95,5 %. Por ejemplo, cualquier tiempo de cristalización que sea  $2 * 28 = 56$  min o más diferente del valor del control de superficie de 118 (91) min es estadísticamente diferente para un nivel de confianza de un 95,5 % (es decir,
- 10  $118 - (2 * 28) = 62$  min o menos). Usando este enfoque estándar, las superficies modificadas de Rejilla de 2,0 mm, Rejilla de 0,5 mm y Círculo de 0,5 mm cumplen todos los criterios estadísticos, y la superficie del motivo de Rejilla de 1,0 mm está muy cerca del valor de corte del extremo inferior de 2 esd de 62 min.
- 15 El análisis estadístico anterior permite la separación de los motivos de Rejilla de 2,0 mm, Rejilla de 1,0 mm, Rejilla de 0,5 mm y Círculos de 0,5 mm de la presente invención de los datos del control de superficie, y el tiempo de cristalización medio para estas cuatro superficies modificadas es de 52 (10) min. La comparación de este valor con el del control de superficie permite dos observaciones importantes que están directamente relacionadas con la utilidad de la presente invención: (1) una reducción de un 56 % en el tiempo de inicio de nucleación y cristalización para las superficies de la presente invención en comparación con el control de superficie es novedosa y útil en
- 20 operaciones de cristalización sensibles al tiempo, y (2) una mejora de 9,1 veces en la consistencia del tiempo (calculada dividiendo la esd del control de superficie por la esd del promedio para las superficies modificadas:  $91/10 = 9,1$ ) es una mejora notable en la reproducibilidad, y las ventajas económicas de la previsibilidad en las operaciones comerciales y de producción están bien establecidas.
- 25 El uso del artículo "un", "uno" o "una" pretende incluir uno o más.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para iniciar la nucleación primaria heterogénea de cristales de un soluto a partir de una solución del soluto que comprende poner en contacto la solución del soluto con un sustrato que tiene una superficie heterogénea amorfa, en el que la superficie heterogénea amorfa del sustrato:
- 5
- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación uniforme preformada;
- 2) se sitúa en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones que son estáticas, dinámicas, o de flujo, o las combinaciones de las mismas;
- 10 y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución del soluto está, o se vuelve, sobresaturada con el soluto.
- 15
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende al menos una etapa adicional de calentamiento, enfriamiento, o modulación térmica del sustrato y la solución del soluto a una temperatura que es diferente a la temperatura ambiente y a continuación calentamiento, enfriamiento, o modulación térmica de la solución del soluto y el sustrato para dar una solución sobresaturada a una temperatura que es igual a, o diferente de, la temperatura ambiente.
- 20
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además aislar los cristales que se forman por contacto de la superficie del sustrato con la solución, a partir del sustrato, o la solución, o las combinaciones de los mismos.
- 25
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la matriz de sitios de nucleación uniforme preformada comprende una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de los mismos.
- 30
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la superficie heterogénea amorfa que incorpora la matriz de sitios de nucleación uniforme preformada modifica el ángulo de contacto, tensión de línea, humectabilidad, o energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con la solución en comparación con la misma superficie que carece de la matriz de sitios de nucleación preformada.
- 35
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la matriz de sitios de nucleación uniforme preformada se somete a ingeniería en la superficie por medio de procedimientos manuales, mecánicos, o químicos, o las combinaciones de los mismos para grabar, grabar al aguafuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie.
- 40
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato comprende polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno, o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos.
- 45
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato es un sustrato de vidrio.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato con la superficie heterogénea amorfa está adherido a un segundo sustrato.
- 50
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el segundo sustrato es un material que es resistente a la disolución en la solución.
12. Un kit que comprende una pluralidad de sustratos para iniciar la nucleación primaria heterogénea de cristales de un soluto a partir de una solución, en el que cada sustrato:
- 55
- 1) incorpora una matriz de sitios de nucleación uniforme preformada en la superficie del sustrato;
- 2) se sitúa en contacto directo con una solución que comprende el soluto que se cristaliza en condiciones que son estáticas, dinámicas, o de flujo, o las combinaciones de las mismas;
- y
- 3) es químicamente resistente a la disolución en la solución;
- 60
- y en el que cada sustrato comprende una matriz de sitios de nucleación uniforme preformada que es idéntica a, o difiere de, otras matrices de sitios de nucleación uniformes preformadas en el kit.
- 65
13. El kit de la reivindicación 12, en el que las matrices de sitios de nucleación uniformes preformadas en la superficie de los sustratos comprenden una matriz de hendiduras, depresiones, almenas, crestas, canales, escalones, pliegues o terrazas, o las combinaciones de los mismos.

- 5 14. El kit de la reivindicación 12, en el que la superficie de los sustratos que incorporan las matrices de sitios de nucleación uniformes preformadas modifica el ángulo de contacto, tensión de línea, humectabilidad, o energía superficial, o las combinaciones de los mismos, con una solución en comparación con la misma superficie que carece de la matriz de sitios de nucleación preformada.
- 10 15. El kit de la reivindicación 12, en el que la matriz de sitios de nucleación uniforme preformada se somete a ingeniería en la superficie por medio de procedimientos manuales, mecánicos, o químicos, o las combinaciones de los mismos para grabar, grabar al aguafuerte, fresar, marcar, litografiar o imprimir aditivamente, o las combinaciones de los mismos, en la superficie.
- 15 16. El kit de la reivindicación 12, en el que los sustratos comprenden polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, poliacrilato, poliacrilamida, poliestireno, divinilbenceno, o vinilbenceno, o las combinaciones de los mismos.
- 15 17. El kit de la reivindicación 12, en el que los sustratos son un sustrato de vidrio.
18. El kit de la reivindicación 12, en el que los sustratos con una superficie heterogénea amorfa están adheridos a una segunda pluralidad de sustratos.
- 20 19. El kit de la reivindicación 18, en el que la segunda pluralidad de sustratos es químicamente resistente a la disolución en la solución.
- 25 20. El kit de la reivindicación 12, en el que el kit comprende un medio para el control de la temperatura, o la modulación de la temperatura, o las combinaciones de los mismos.

FIG. 1

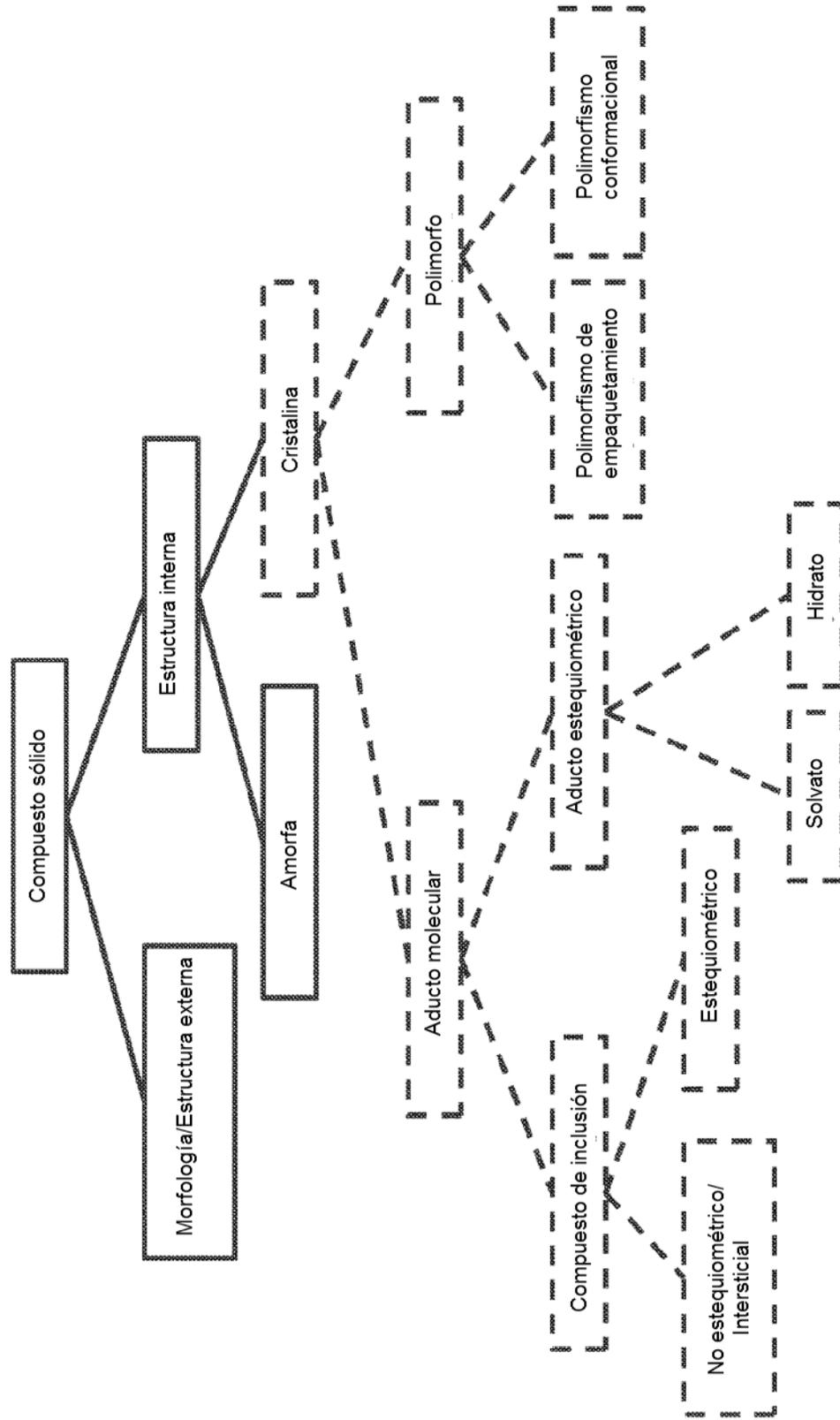


FIG. 2

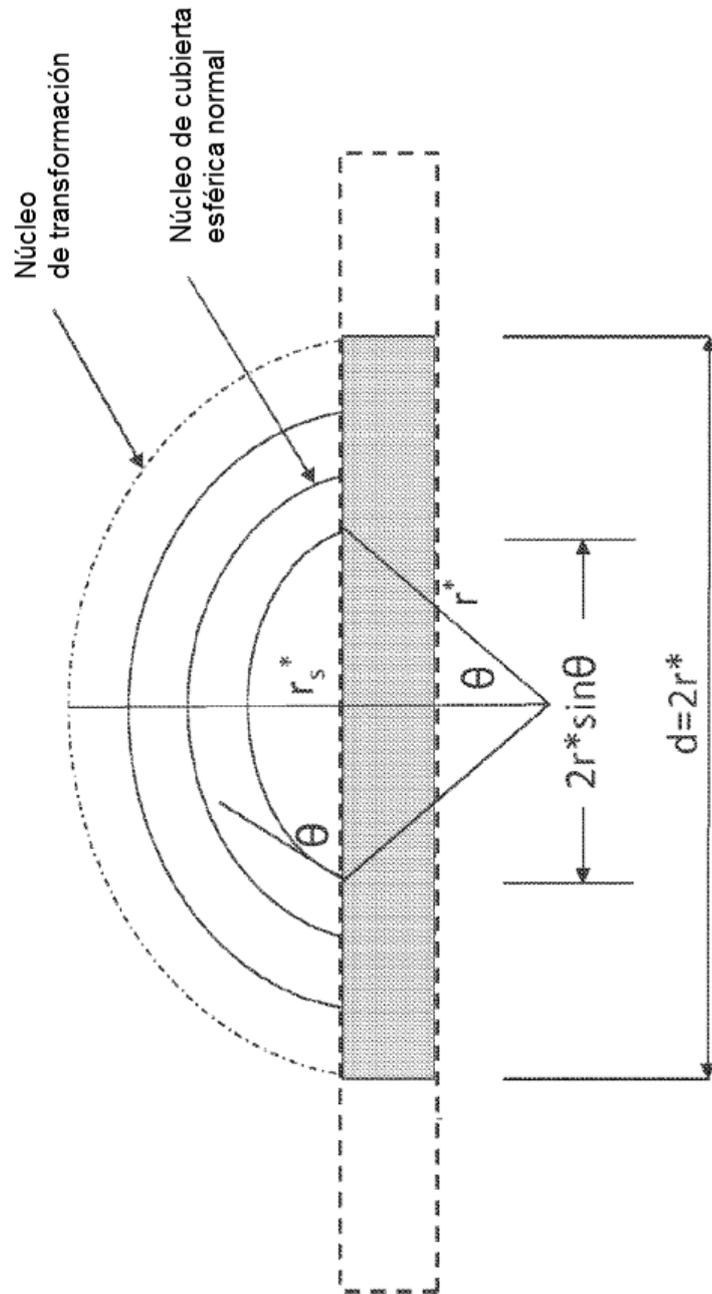


FIG. 3

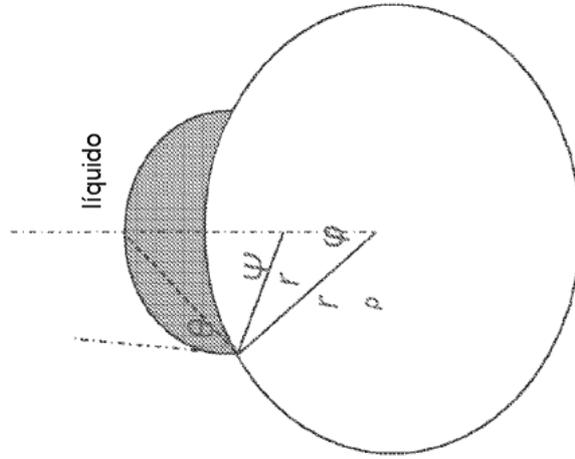


FIG. 4

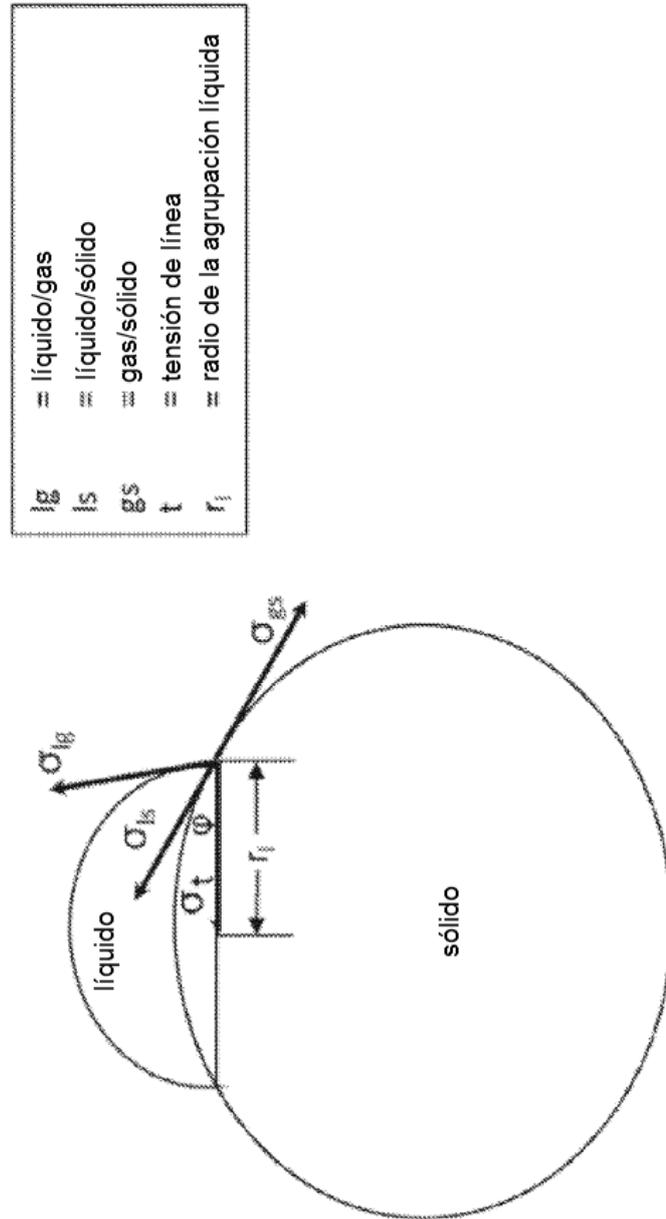


FIG. 5

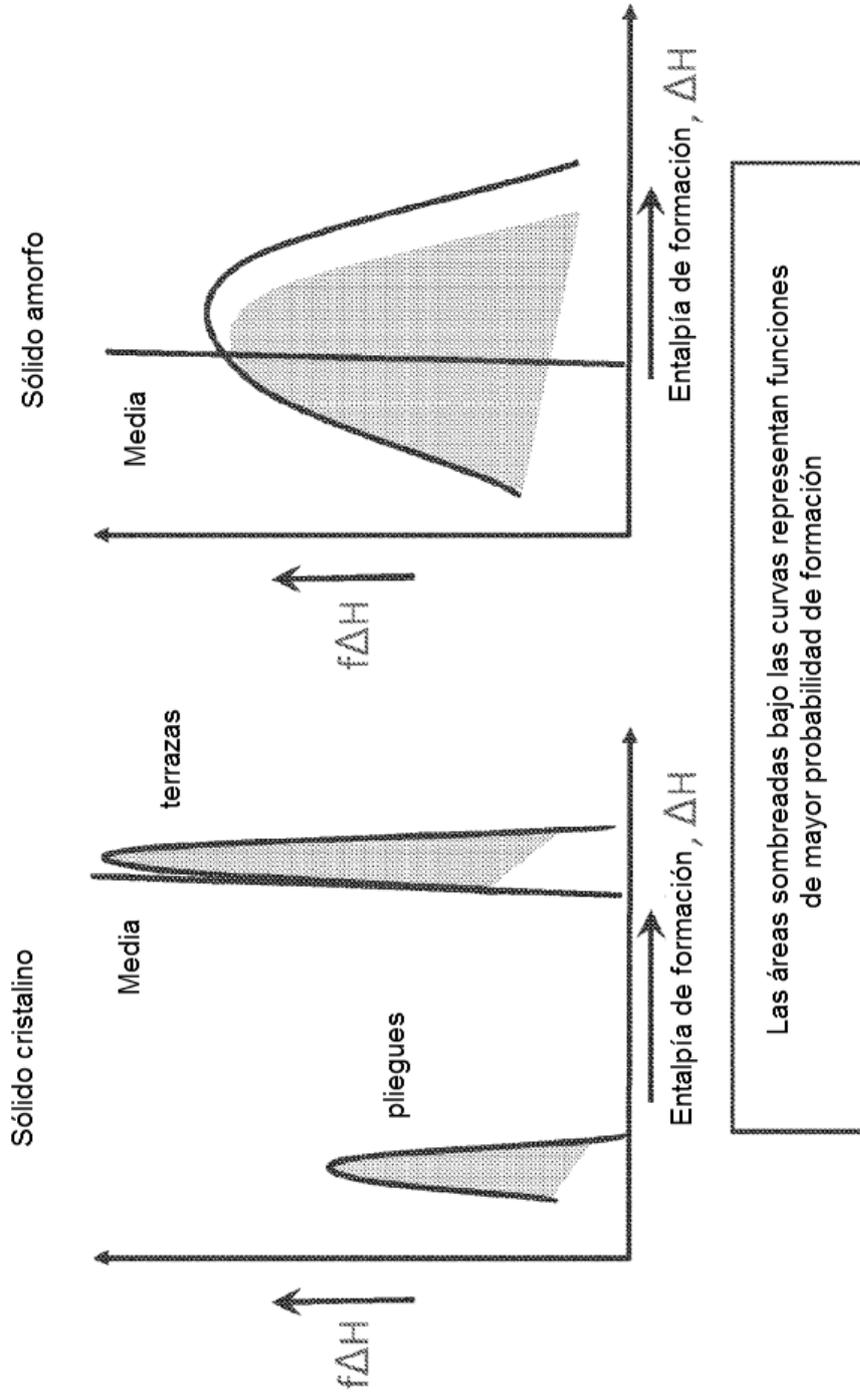


FIG. 6

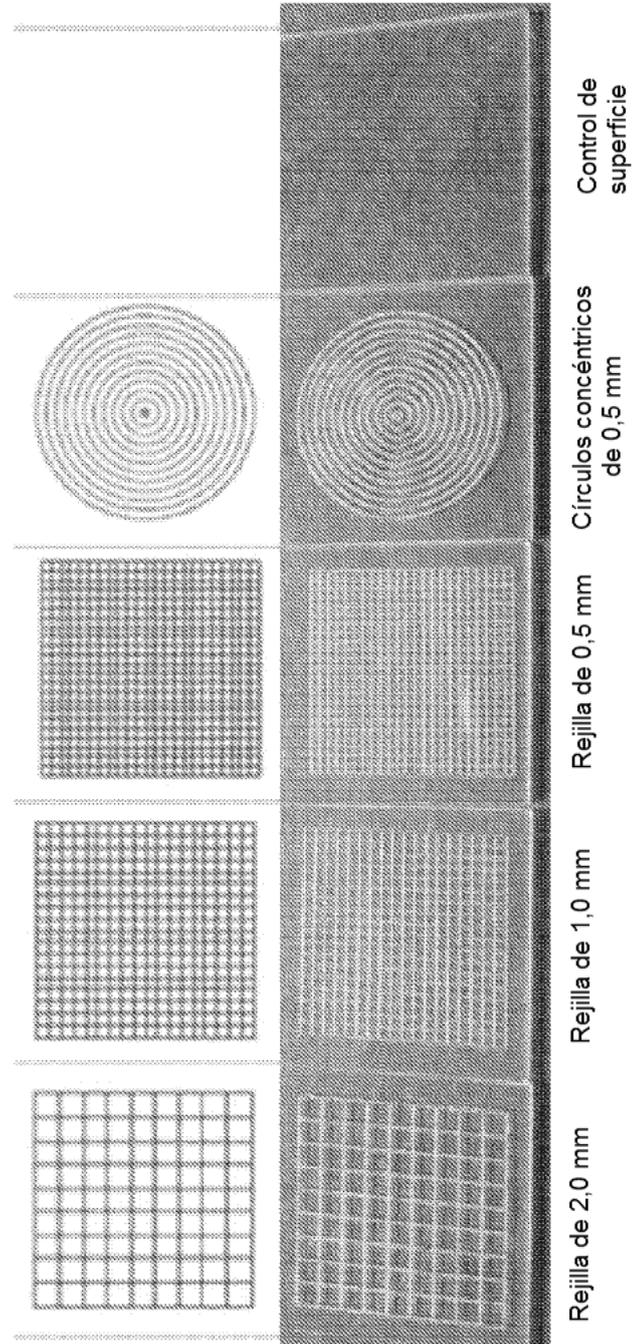


FIG. 7

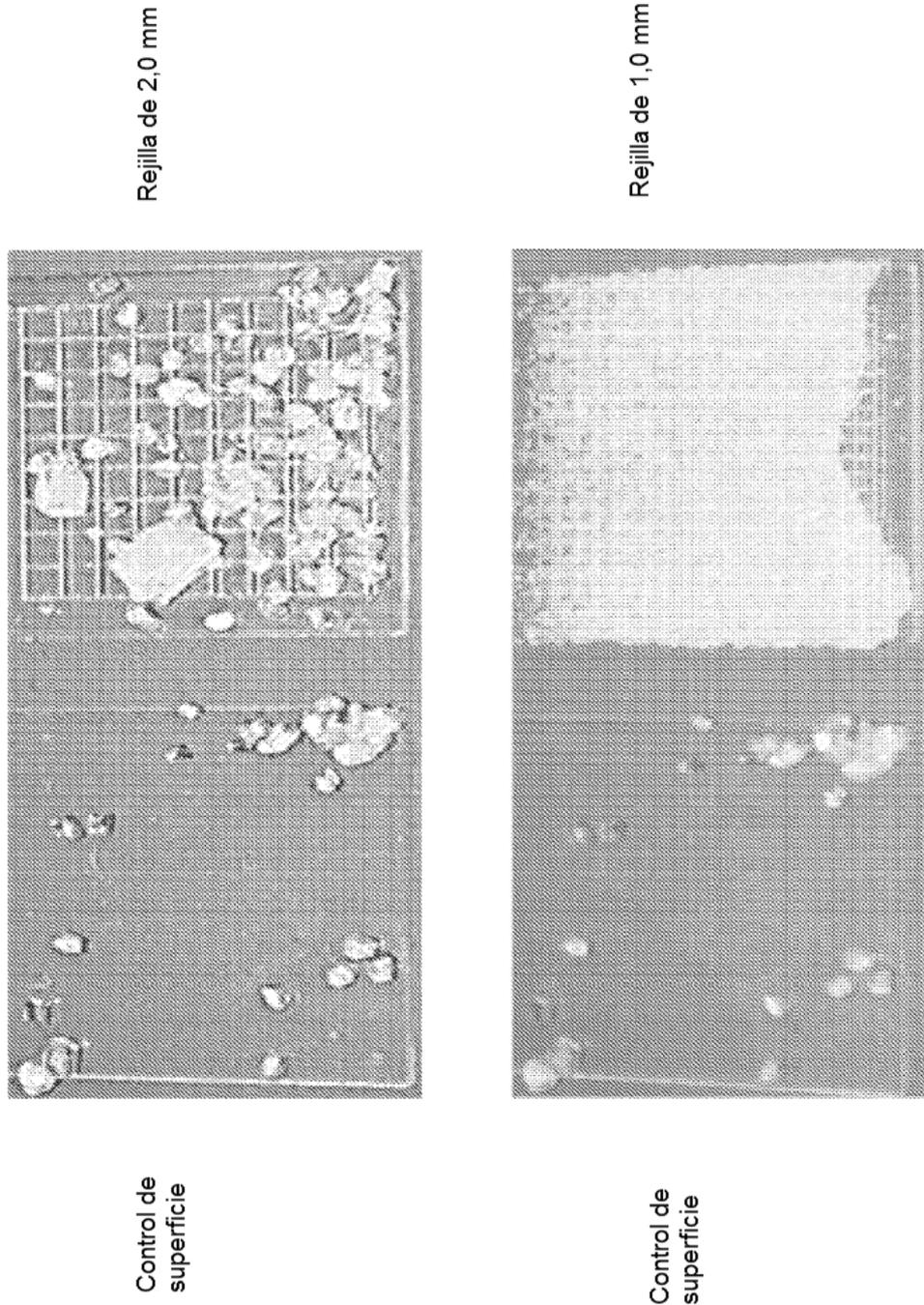


FIG. 7 (cont.)

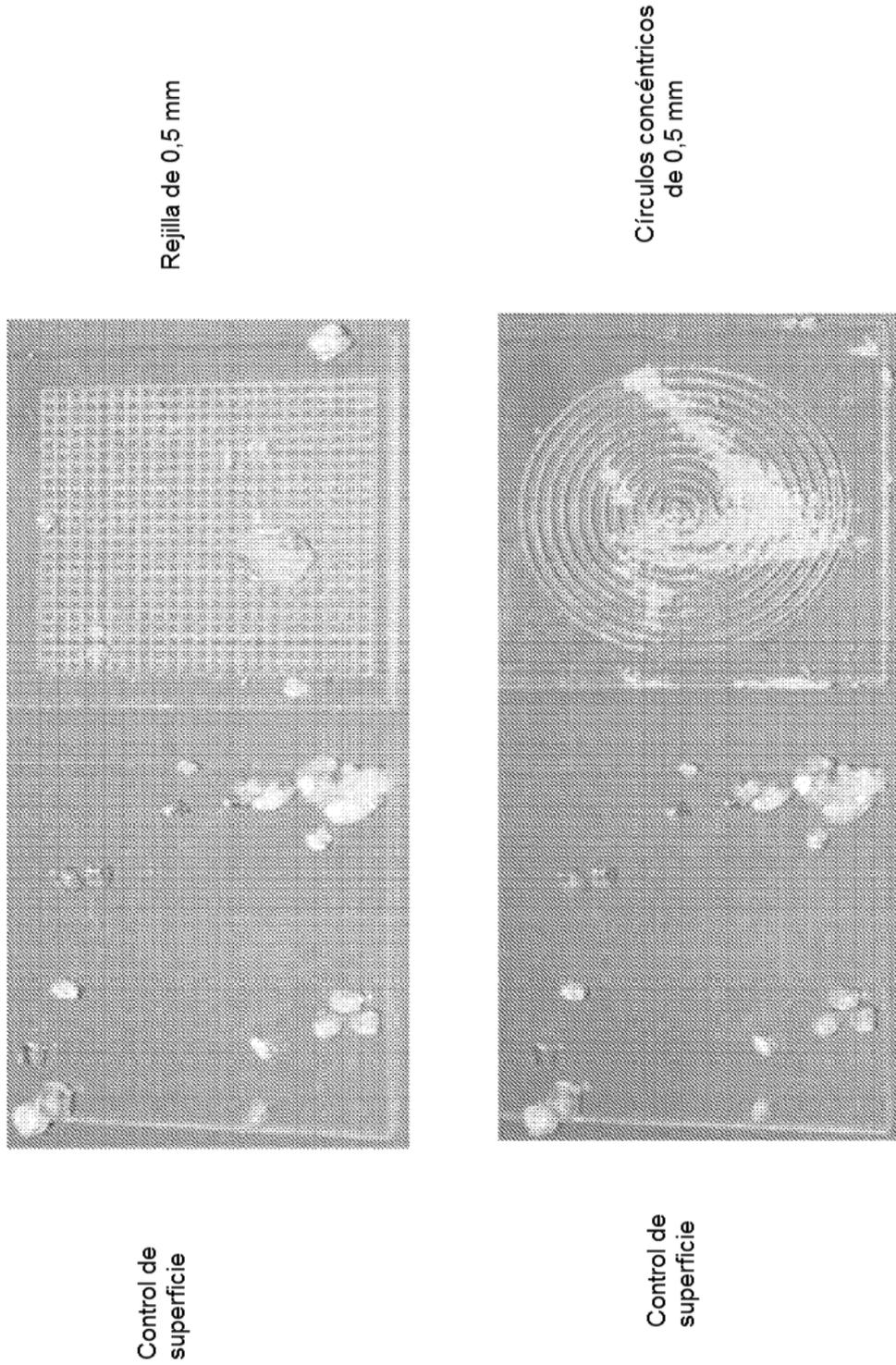


FIG. 8

