

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Liofilizzazione di prodotti farmaceutici
in un micro-liofilizzatore**



Relatore

prof. Davide Fissore

Candidato

Ylenia Foddi

Marzo 2020

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Fasi della liofilizzazione	2
1.1.1 Essiccamento primario e fenomeni di trasporto coinvolti	4
1.2 Scale-down e scale-up: utilizzo di Mini-FD e Micro-FD	7
1.3 Controllo dei parametri durante il processo di liofilizzazione	8
1.3.1 Principi di logica <i>fuzzy</i>	9
1.4 Scopo del lavoro di Tesi	11
2. Apparecchiature di laboratorio e metodologie	13
2.1 MicroFD	13
2.1.1 <i>LyoPAT</i>	15
2.2 REVO	17
2.3 Calcolo del coefficiente di scambio termico K_v	18
2.4 Calcolo della resistenza al flusso di vapore R_p	19
2.5 Metodologie sperimentali	20
2.5.1 Prove sperimentali	23
2.5.2 Preparazione dei campioni	24
2.6 Sistema di controllo <i>fuzzy</i>	25
2.6.1 Variabili e funzioni di appartenenza	25
2.6.2 Regole <i>if-then</i>	30
2.6.3 Applicazione delle regole e defuzzificazione	31
2.6.4 Prove sperimentali	32
2.6.5 Preparazione dei campioni	32
3. Risultati e discussione	35
3.1 Flaconi 6R	35
3.1.1 Parametro K_v	36
3.1.2 Parametro R_p	42
3.2 Flaconi 20R	44
3.2.1 Parametro K_v	45
3.2.2 Parametro R_p	48
3.3 Controllo con logica <i>fuzzy</i>	50
3.3.1 $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$, $P_c = 90\text{mTorr}$	50
3.3.2 $T_{shelf} = -20^\circ\text{C}$, $P_c = 60\text{mTorr}$	52
4. Conclusioni	55

5. Bibliografia	59
6. Notazioni	61
6.1 Grecismi.....	62
7. Ringraziamenti	63

1. Introduzione

La liofilizzazione o crio-essiccamento consiste nell'eliminazione di una fase liquida da un prodotto, preventivamente congelato, per mezzo della sua sublimazione. Solitamente il processo viene effettuato sottovuoto, anche se attualmente esistono degli esempi di liofilizzazione atmosferica. Tale tecnica:

- permette la stabilizzazione di vari prodotti mantenendone alta la qualità, compresi quelli termolabili, come le proteine, grazie alle basse temperature utilizzate;
- può essere effettuata in condizioni di sterilità e porta all'ottenimento di un prodotto solido conservabile per tempi più lunghi e a temperatura più alta (ambiente, o al massimo di refrigerazione) rispetto a quelli che si possono avere senza trattamento;
- consente di ottenere una struttura facilmente reidratata.

Per questi motivi trova oggi largo impiego nel settore farmaceutico e in quello alimentare.

Lo svantaggio principale di questa tecnica è legato agli elevati costi, che ne limitano l'applicazione in campo industriale; tuttavia, nel settore farmaceutico il costo dei processi di post-trattamento di un enzima o un vaccino sono decisamente minori di quelli richiesti per la sua purificazione. Inoltre, il prodotto farmaceutico può avere un prezzo alto a causa dell'elevata purezza e qualità richiesta: i costi di processo in questo caso non sono quindi rilevanti, perché il farmaco deve soddisfare alti standard di sterilità, purezza e stabilità, al contrario, invece, del caso dei prodotti alimentari, in cui vi sono limitazioni meno rigorose (Franks and Auffret, 2008).

Il processo attualmente utilizzato risale alla fine dell'Ottocento, ma ha assunto una notevole importanza nel settore farmaceutico durante la Seconda Guerra Mondiale, a causa della necessità di elevate quantità di plasma; negli anni Cinquanta ha cominciato a diffondersi a livello industriale, per cui sono aumentati gli studi volti alla comprensione dei fenomeni coinvolti nel processo e, a seguire, alla sua ottimizzazione (Franks and Auffret, 2008).

La liofilizzazione consta di 3 fasi principali: il congelamento, l'essiccamento primario e l'essiccamento secondario; ad esse vanno poi aggiunte la fase iniziale di preparazione del prodotto e la fase finale di estrazione dalla camera di liofilizzazione e conservazione a temperatura adeguata alle specifiche caratteristiche delle sostanze coinvolte. Il prodotto finale può poi essere venduto come tale o, dopo il trasporto nel sito finale di stoccaggio o di vendita, può essere ricostituito con il liquido; nella maggior parte dei casi il liquido da rimuovere è l'acqua (Rey, 2010).

Per poter realizzare il processo di liofilizzazione sono richieste alcune apparecchiature fondamentali: un sistema di refrigerazione, una camera di liofilizzazione, un condensatore e una pompa da vuoto (Franks and Auffret, 2008). In ambito farmaceutico vengono usati spesso flaconi di varie dimensioni per contenere la soluzione da liofilizzare: essi vengono posti su un ripiano nella camera di liofilizzazione, all'interno del quale scorre un fluido che viene refrigerato tramite il sistema di refrigerazione durante la fase di congelamento, e riscaldato durante la fase di sublimazione (Wang et al., 2012); il condensatore raccoglie il vapore proveniente dalla camera di liofilizzazione; la pompa da vuoto mantiene le basse pressioni richieste per il processo.

In figura 1.1 è presente uno schema del sistema di apparecchiature appena descritto:

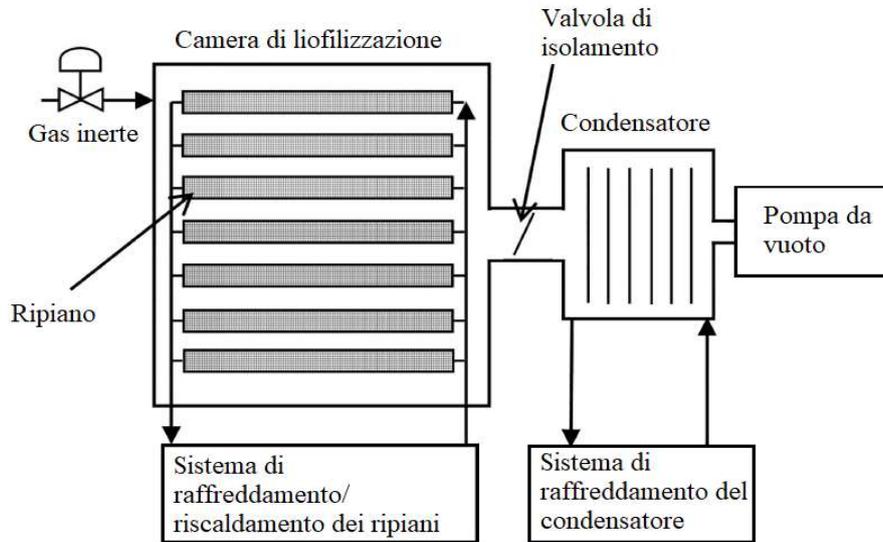


Figura 1.1 Schema di un liofilizzatore. Figura tratta da *Fissore, 2013*, con modifiche.

1.1 Fasi della liofilizzazione

Le tre fasi principali della liofilizzazione possono essere visualizzate sul diagramma di stato dell'acqua, come rappresentato in figura 1.2:

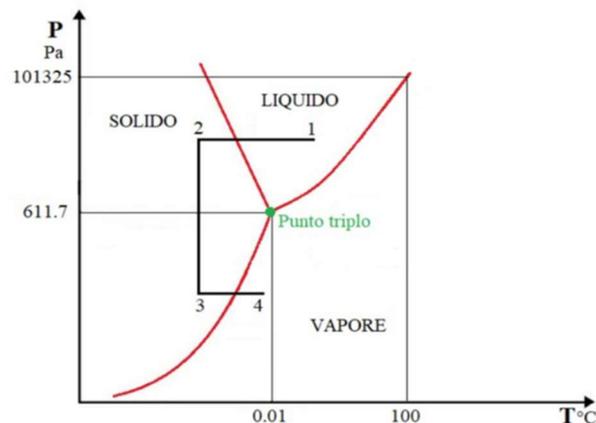


Figura 1.2 Fasi del processo di liofilizzazione evidenziate sul diagramma di stato dell'acqua.

La trasformazione $1 \rightarrow 2$ rappresenta il congelamento, che viene fatto a partire da condizioni di temperatura e pressione maggiori rispetto a quelle caratterizzanti il punto triplo; le trasformazioni $2 \rightarrow 3$ e $3 \rightarrow 4$ corrispondono invece alla fase dell'essiccamento primario, in cui viene inizialmente diminuita la pressione e poi innalzata la temperatura, permettendo così la sublimazione dell'acqua; la fase dell'essiccamento secondario potrebbe essere semplicemente

rappresentata con una prosecuzione della linea 3→4, in quanto viene solitamente condotta nelle stesse condizioni di pressione di quello primario ma aumentando la temperatura fino ad arrivare a valori dell'ordine di quella ambiente.

Lo stadio del **congelamento** consiste nel raffreddare il prodotto sino ad una determinata temperatura, al di sotto del punto di congelamento dell'acqua (Fissore, 2013): questo permette la separazione della maggior parte dell'acqua dalle sostanze di interesse, ovvero il principio attivo e i suoi eccipienti, sotto forma di cristalli di ghiaccio; in questa fase i principali parametri in gioco sono la temperatura di congelamento, la velocità di raffreddamento e il tempo di mantenimento alla temperatura di congelamento. Il primo parametro varia in base alla natura del prodotto, la quale determina anche le temperature critiche da evitare nella fase di essiccamento: la temperatura di collasso, ovvero quella al di sopra della quale il prodotto, nel caso sia amorfo, collassa durante la liofilizzazione a causa della perdita delle sue caratteristiche macroscopiche; la temperatura eutettica, che caratterizza solo i materiali cristallini e al di sopra della quale il prodotto fonde; la temperatura di transizione vetrosa, al di sotto della quale i materiali amorfi presentano struttura rigida e fragile. È importante lavorare a temperature al di sotto del punto eutettico in caso di materiali cristallini, o al di sotto della temperatura di transizione vetrosa per i materiali amorfi durante l'essiccamento primario. La velocità di raffreddamento, solitamente di circa 1°C/min, è importante per la determinazione della numerosità e della dimensione dei cristalli di ghiaccio che si formano, i quali sono presenti in maggior numero e con piccole dimensioni tanto più quanto maggiore è questa velocità (Wang et al., 2012); il tempo di mantenimento a bassa temperatura, necessario per completare il congelamento della fase liquida, varia invece in base al volume di soluzione introdotto nella camera di liofilizzazione, e aumenta con l'aumentare del volume (Tang and Pikal, 2004).

Durante la fase di **essiccamento primario** avviene la sublimazione dei cristalli di ghiaccio, con la conseguente formazione di una "torta", o *cake*, porosa; per favorire la sublimazione del ghiaccio, la pressione viene diminuita in modo tale da essere inferiore alla tensione di vapore del ghiaccio, mentre la temperatura viene innalzata per aumentare la quantità di energia termica disponibile, essendo la sublimazione un processo endotermico (Morais et al., 2016). In questo stadio la pressione della camera e la temperatura del ripiano su cui il prodotto è poggiato sono due parametri fondamentali per controllare i fenomeni di trasporto di massa e calore, in quanto incidono sia sulla temperatura del prodotto che sulla durata della fase stessa (Fissore, 2013); in particolar modo, la temperatura deve rimanere al di sotto del valore critico della formulazione per evitare la perdita della struttura dello strato poroso ottenuto come prodotto, e al di sotto della temperatura di denaturazione delle sostanze coinvolte (Passot et al., 2010).

L'**essiccamento secondario** serve per la rimozione, tramite desorbimento, dell'acqua legata, ovvero di quella parte di liquido coinvolto in legami molecolari con le sostanze trattate e che per questo motivo è più difficile da rimuovere (Wang et al., 2012). Per facilitare il desorbimento è necessario aumentare la temperatura del ripiano nell'ordine della temperatura ambiente, dopo essersi assicurati che l'essiccamento primario, e quindi la rimozione del ghiaccio, sia già terminato, in modo da evitare il collasso della torta o *cake* porosa formata (Pikal, 1994). In questa fase i principali parametri da considerare sono: la velocità di riscaldamento, che deve essere mantenuta bassa specialmente per i materiali amorfi per evitare il collasso; la temperatura del ripiano e l'umidità residua nel prodotto, dalla quale dipende la pressione di saturazione dell'acqua legata (Wang et al., 2012). La pressione della camera invece, come già introdotto in precedenza, non viene solitamente modificata rispetto alla condizione adottata nella fase di essiccamento primario (Tang and Pikal, 2004; Wang et al., 2012).

1.1.1 Essiccamento primario e fenomeni di trasporto coinvolti

Come già detto in precedenza, i due parametri fondamentali da considerare durante l'essiccamento primario sono la temperatura del ripiano e la pressione della camera. Per capire in che modo essi siano implicati nella determinazione della temperatura del prodotto e della durata totale della fase, bisogna innanzitutto modellare i fenomeni di trasporto di calore e di massa che vi sono coinvolti (Fissore, 2013).

Possono essere utilizzati modelli multidimensionali, come quello bidimensionale assialsimmetrico impiegato da Brülls et al., 2002, per lo studio del trasferimento di calore durante la liofilizzazione in flacone: essi hanno infatti cercato un modello matematico basato su costanti fisiche e fattori geometrici, che considerasse anche l'accumulo di calore all'interno del vetro del flacone. I modelli multidimensionali hanno il vantaggio di essere più precisi, tuttavia richiedono la conoscenza di valori spesso non conosciuti e difficilmente stimabili, nonché una certa spesa in termini di tempo dovuta alla complessità dei calcoli da effettuare (Fissore, 2013); per questo motivo è preferibile utilizzare un modello monodimensionale, con il vantaggio di essere di semplice applicazione e di rappresentare una buona approssimazione dei fenomeni reali, anche se risulta essere meno preciso in quanto trascura quanto accade nella direzione radiale (Brülls et al., 2002).

Il calore viene trasportato: per conduzione, dal ripiano al prodotto presente sul fondo del flacone; per irraggiamento, dalle pareti, da eventuali ripiani presenti sopra quello in cui vengono posizionati i flaconi e dalle cornici metalliche talvolta usate per posizionare i flaconi e lasciate durante il processo al fine di evitare spostamenti dovuti alle vibrazioni dell'apparecchiatura; per convezione, sia attraverso il gas presente nello spazio tra il piano riscaldato di appoggio e il fondo ricurvo del flacone (Goldman et al., 2019; Fissore, 2013), sia attraverso il vapor d'acqua presente nella camera (Scutellà et al., 2017).

Nel modello monodimensionale semplificato l'unica direzione considerata è quella dell'altezza del flacone; esso è costituito dal bilancio di energia e dal bilancio di massa, presenti rispettivamente nelle equazioni 1.1 e 1.2:

$$J_q = J_w \cdot \Delta H_s \quad (1.1)$$

$$\frac{dL_{frozen}}{dt} = - \frac{1}{\rho_{frozen} - \rho_{dried}} J_w \quad (1.2)$$

Il calore viene trasmesso dal ripiano al fondo del flacone, per cui il flusso di calore J_q può essere espresso come:

$$J_q = K_v (T_{fluid} - T_B) \quad (1.3)$$

dove $T_{fluid} - T_B$ è la differenza di temperatura tra il fluido che scorre nel ripiano e quella del prodotto presente sul fondo del flacone, mentre K_v è il coefficiente di trasporto di calore globale tra il fluido che scorre nel ripiano e il prodotto situato sul fondo del flacone; esso è fortemente influenzato dalla pressione della camera, ma anche dalla geometria del flacone utilizzato (Tang and Pikal, 2004) e dalla posizione sul ripiano (interna o esterna), mentre dipende solo in piccola parte dalla temperatura.

In particolar modo si vuole approfondire il ruolo della posizione del flacone nella determinazione del parametro K_v : i flaconi esterni risultano avere infatti temperature più alte di qualche grado rispetto a quelli situati nella parte centrale, in quanto ricevono più calore sia dal vapore d'acqua che li circonda che dalle eventuali cornici metalliche presenti; i flaconi interni non sono a contatto con la cornice esterna, per cui non ne sono influenzati, e ricevono meno calore dal gas presente nella camera in quanto risultano più isolati grazie alla presenza delle file

esterne (Scutellà et al., 2017). L'influenza dell'irraggiamento nell'effetto di bordo o *edge-effect* deve essere tenuta in conto nello *scale-up* a livello industriale: si può pensare di adottare, nei liofilizzatori da laboratorio, degli schermi di protezione contro l'irraggiamento da pareti e porta per mimare meglio l'effetto che ha in un liofilizzatore industriale (Rambhatla and Pikal, 2003). Questo effetto è da minimizzare il più possibile per vari motivi, quali il raggiungimento della condizione di omogeneità in ogni batch e la preservazione delle caratteristiche finali di qualità del prodotto: infatti, la maggiore temperatura nei flaconi esterni implica maggiori flussi di sublimazione, quindi durata minore dell'essiccamento primario in essi, e pericolo più alto di superamento delle temperature di collasso durante il processo (Scutellà et al., 2017).

Il flusso di sublimazione, ovvero l'acqua che nell'unità di tempo passa attraverso l'interfaccia di sublimazione dallo strato congelato allo strato secco J_w è espresso come:

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{w,i} - p_{w,c}) \quad (1.4)$$

dove $p_{w,i} - p_{w,c}$ è la differenza tra la pressione parziale del vapore acqueo presente all'interfaccia e quella presente nella camera, mentre R_p rappresenta la resistenza totale al flusso di vapore, ovvero la somma dei contributi alla resistenza dati dallo strato secco, dal tappo e dalla camera; essa è generalmente, a parità di condizioni operative, una funzione dello spessore dello strato secco.

I flussi sopra descritti possono essere visualizzati nella figura 1.3:

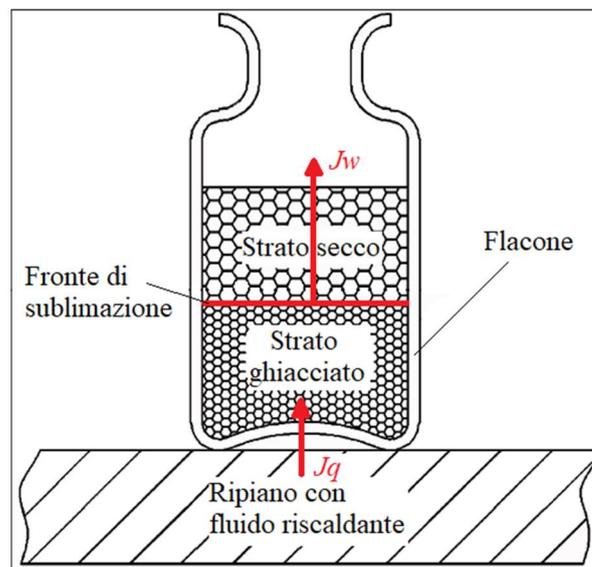


Figura 1.3 Rappresentazione dei flussi di calore e di sublimazione all'interno del flacone durante l'essiccamento primario. Figura tratta da Wang et al., 2012, con modifiche.

I due parametri K_v e R_p possono essere ricavati sperimentalmente; in entrambi i casi è necessario misurare la temperatura del prodotto sul fondo del flacone. Essi vengono utilizzati per la risoluzione delle equazioni del modello monodimensionale utilizzato per la rappresentazione dell'essiccamento primario (Fissore, 2013).

Accanto alla temperatura del prodotto nella fase di essiccamento primario, è importante stabilire la **durata** di questa fase, soprattutto per evitare di iniziare prima del dovuto l'essiccamento

secondario, con conseguente collasso della struttura non ancora completamente libera dal ghiaccio. Esistono varie tecniche basate sulla misura di variabili diverse, ognuna con i propri vantaggi e svantaggi:

- Ci si può basare sul profilo di temperatura del prodotto, stabilendo che l'essiccamento primario finisce quando la temperatura del prodotto raggiunge quella del ripiano: questa tecnica presenta molti problemi, dovuti al fatto che le termocoppie utilizzate per la misura influenzano la nucleazione all'interno del flacone, provocando un essiccamento più veloce rispetto a quello dei flaconi in cui non sono presenti, per cui non sono rappresentativi dell'intero batch; si può ovviare a questo problema aumentando del 10-30% il valore ottenuto (Patel et al., 2010);
- Un'altra tecnica è basata sull'utilizzo di misuratori di pressione di diverso tipo all'interno della camera: essa può essere misurata attraverso manometri di tipo capacitivo, come quello MKS® Baratron, o di tipo termo-conduttivo, come il Pirani; la differenza tra i due è che mentre nel Pirani la misura ottenuta dipende dalla quantità di vapore acqueo presente nella camera, il Baratron rileva la pressione indipendentemente dalla composizione del gas (Fissore, 2013). Durante l'essiccamento primario i due sensori forniscono misure diverse di pressione, dovute alla differenza della conduttività termica dell'azoto e quella del vapore acqueo: il rapporto tra le misure di pressione Pirani/Baratron è di circa 1,6 durante l'essiccamento primario, ed è pari al rapporto tra la conduttività termica del vapore acqueo e quella dell'azoto. Si può stabilire la fine della fase in corrispondenza del momento in cui il rapporto tra le due pressioni comincia a decrescere rapidamente (*onset*), o in cui smette di decrescere rapidamente (*offset*), oppure nel punto medio tra i due (*midpoint*); l'utilizzo del *midpoint* è forse il più significativo (Patel et al., 2010);
- Il *Pressure Rise Test* è un'altra metodologia utilizzata per la determinazione della durata, e consiste nella misura dell'aumento di pressione che avviene nella camera quando essa viene isolata dal condensatore per un breve periodo di tempo: questo aumento è proporzionale all'umidità presente nel prodotto, per cui la fine dell'essiccamento primario corrisponde al raggiungimento di un certo valore limite della velocità con cui la pressione sale (Wang, 2000); gli svantaggi di questa tecnica sono connessi alla necessità di interrompere il processo di liofilizzazione, anche se per un breve intervallo di tempo, e di disporre di una valvola a chiusura rapida (Patel et al., 2010).

Esistono anche altri metodi, basati per esempio sulla misura della differenza di pressione tra il condensatore e la camera, oppure sulla misura della concentrazione del vapore acqueo nel tubo di connessione tra la camera e il condensatore attraverso il TDLAS (*Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy*), tecnologia che però non è ampiamente diffusa in quanto costosa (Patel et al., 2010).

L'essiccamento primario risulta essere la fase più dispendiosa delle tre, essendo la più lunga: per l'ottimizzazione della sua durata è richiesta una vasta gamma di esperimenti volta all'individuazione dei valori di pressione della camera e temperatura del fluido riscaldante più adatti alla singola sostanza da trattare, ovvero che permettano l'ottenimento di una buona qualità del prodotto finale, ma allo stesso tempo con una riduzione dei tempi di essiccamento; la campagna sperimentale è a sua volta costosa sia in termini di tempo che dal punto di vista economico (utilizzo di campioni, consumo di energia elettrica). Per questo motivo sono stati prodotti vari modelli matematici che permettono l'individuazione delle condizioni operative tramite il calcolo del *design space* e l'uso di pochi esperimenti per la determinazione dei parametri del modello (Giordano et al., 2011).

1.2 Scale-down e scale-up: utilizzo di Mini-FD e Micro-FD

Come già citato precedentemente, lo svantaggio principale della tecnica di liofilizzazione è il suo costo in termini economici e di consumi di energia, legati sia al processo in sé sia allo studio necessario per individuare i parametri operativi da adottare nelle tre fasi (soprattutto nell'essiccamento primario), che sono specifici per le sostanze da trattare e quindi sono spesso ricavati tramite *Trial&Error*; in particolar modo, condurre una campagna sperimentale di questo tipo è difficile quando c'è carenza di API (*Active Pharmaceutical Ingredient*), ovvero di principio attivo.

Si potrebbe pensare di caricare un numero limitato di flaconi all'interno della camera di liofilizzazione per condurre gli esperimenti, ma ciò implicherebbe l'ottenimento di risultati poco attendibili a causa dell'aumento del rapporto tra flaconi esterni e flaconi centrali, con conseguente aumento dell'effetto di bordo nei campioni (Obeidat et al., 2018); inoltre, lo studio del processo in queste condizioni può non far emergere alcune problematiche che invece sorgerebbero con l'utilizzo delle condizioni di carico totale, come la presenza di *choked flow* o flusso strozzato nel tubo di collegamento con il condensatore o il sovraccarico del condensatore stesso. Un'altra questione che potrebbe emergere è la differenza di composizione del gas presente nella camera: la presenza di pochi flaconi implica un minor flusso di vapore acqueo, con conseguente aumento della quantità di aria o azoto (a seconda di cosa viene utilizzato nell'apparecchiatura per controllare la pressione: di solito a livello industriale si tende ad utilizzare un gas inerte, ma è possibile utilizzare anche l'aria); la composizione del gas nella camera è molto importante perché influenza la conduttività termica del gas e quindi il trasferimento di calore tramite convezione, e quest'ultima diminuisce se la presenza di vapore acqueo diminuisce, con aumento dei tempi richiesti per l'essiccamento a causa della diminuzione della temperatura del prodotto (Patel and Pikal, 2011).

Per questo motivo, sono stati pensati dei liofilizzatori di piccole dimensioni, in cui introdurre un numero limitato di flaconi diminuendo i costi e i tempi degli esperimenti: il MiniFD ed il MicroFD. Nei vari studi effettuati su questo tipo di apparecchiature si è cercato di testare l'effettiva capacità di simulazione delle condizioni di un normale liofilizzatore da laboratorio, comparando i valori di K_v e i profili di temperatura ottenuti.

Obeidat et al., 2018, hanno realizzato il **MiniFD**: esso consiste in un liofilizzatore con camera di piccole dimensioni, contenente solo 7 flaconi da 20 ml di volume, in cui è possibile regolare la temperatura delle pareti in modo da simulare il comportamento dei flaconi esterni o centrali di un normale liofilizzatore; è stato realizzato in 2 versioni, una con 4 pareti con temperatura modulabile e una con una parete cilindrica interna. I risultati sperimentali ottenuti con il MiniFD hanno approssimato con adeguata accuratezza quelli ottenuti con i normali liofilizzatori da laboratorio: è ritenuto dunque un loro valido sostituto soprattutto nella fase iniziale di una campagna sperimentale volta allo sviluppo di un nuovo processo, in cui lo studio dei coefficienti di scambio di calore, dei profili di temperatura durante il processo e della resistenza del prodotto secco sono i principali obiettivi.

Il **MicroFD** della MillRock Technology può contenere fino a 19 flaconi di dimensioni 6R oppure 7 flaconi 20R; in entrambi i casi essi hanno disposizione a maglia esagonale, e si può decidere di simulare il comportamento dei flaconi esterni o di quelli interni di un liofilizzatore classico variando la temperatura del *LyoSim*, un anello metallico che circonda i flaconi, a contatto con essi, in cui scorre un fluido di temperatura regolabile, impostabile come *offset* rispetto alla temperatura del prodotto. Il *LyoSim* è realizzato dall'assemblaggio di diversi pezzi smontabili, per cui è possibile passare dalla configurazione per 19 flaconi a quella per 7 flaconi e viceversa. Esso è dotato inoltre di *Accuflux*, un sensore di flusso termico che permette il

calcolo del parametro K_v , evitando la via gravimetrica, molto utilizzata negli studi in laboratorio per la sua semplicità, ma abbastanza dispendiosa in termini di tempo e soggetta a errori che dipendono sia dalla misurazione sia dalla soggettività della durata stabilita per la prova (Thompson et al., 2017).

L'accuratezza sperimentale del MicroFD è stata testata in diversi studi:

- In Goldman et al., 2019, è stata provata la sua capacità di mimare sia il trasferimento di calore che la qualità del prodotto ottenuti nei normali liofilizzatori da laboratorio, attraverso la comparazione dei valori del parametro K_v , della storia termica del prodotto e dei CQAs (*Critical Quality Attributes*);
- In Fissore et al., 2019, è stata dimostrata l'omogeneità delle condizioni ottenute nel batch costituito da 19 flaconi 6R, valutata attraverso il valore medio della velocità di essiccamento del prodotto e la deviazione standard riferite sia ai flaconi centrali che a quelli esterni, nonché attraverso i profili di temperatura del prodotto nei flaconi centrali e nei flaconi esterni; inoltre, sono state valutate le differenze nell'utilizzo di diversi *offset* negativi relativi nell'impostazione del *LyoSim*, con il fine di individuarne il valore ottimale;
- In Fissore et al., 2020 è stata condotta una vasta campagna sperimentale per l'individuazione della temperatura ottimale a cui impostare il *LyoSim* per la simulazione dei flaconi centrali di un batch, sia per i flaconi 6R che per quelli 20R; inoltre, una volta individuato il valore ottimale dell'*offset*, è stato possibile valutare la durata dell'essiccamento primario e compararla con quella ottenibile in una apparecchiatura di scala pilota.

In tutti i casi sono state utilizzate diverse condizioni di pressione della camera, di temperatura del ripiano e di temperatura del fluido dell'anello, testate su soluzioni acquose di saccarosio o mannitolo preparate con diverse concentrazioni; si ha quindi una vasta gamma di dati sperimentali disponibili sull'utilizzo del MicroFD.

Sia tramite l'utilizzo del MiniFD che del MicroFD è stato possibile realizzare uno *scale-down* adeguato del processo di liofilizzazione (almeno dal punto di vista termico), con conseguente risparmio di risorse e tempo; vi sono tuttavia alcune difficoltà intrinseche nello *scale-up* dal laboratorio alla produzione industriale, riguardanti per esempio l'umidità dell'ambiente e i tempi di carico dell'apparecchiatura, ma soprattutto la differenza tra le temperature di nucleazione del ghiaccio presente tra la scala di laboratorio e quella industriale, che non possono essere considerate appieno nello studio in scala di laboratorio, neanche con l'utilizzo del MiniFD e del MicroFD (Obeidat et al., 2018).

1.3 Controllo dei parametri durante il processo di liofilizzazione

Durante tutte le fasi della liofilizzazione è necessario tenere sotto controllo alcune variabili, come la pressione della camera, la temperatura del prodotto, la temperatura del ripiano e, nel caso dell'utilizzo di apparecchiature come il MiniFD e il MicroFD sopra descritti, l'omogeneità del batch, in quanto fondamentali per ottenere un'alta qualità del prodotto finale, rappresentativa di quanto accade in una apparecchiatura industriale. In particolar modo, nel 2004 la *US Food and Drug Administration* ha creato una Guida per le Tecnologie Analitiche Industriali di Processo (PAT), con l'obiettivo di spingere le aziende farmaceutiche ad utilizzare strategie e strumenti adeguati per garantire la qualità del prodotto già in fase di progettazione del processo produttivo, sostituendola alla valutazione di essa solo nel prodotto finale (Fissore, 2017).

Pisano et al., 2013, hanno illustrato che l'ottimizzazione delle variabili sopra citate può essere effettuata principalmente in 3 modi, ognuno dei quali presenta vantaggi e svantaggi:

- Uso di un **design space**, ovvero una mappa bidimensionale costituita dalla combinazione di diversi valori di temperatura del ripiano e pressione della camera, finalizzata all'individuazione delle migliori condizioni per l'ottenimento della qualità finale desiderata; spesso viene associato ad una serie di esperimenti per la verifica delle combinazioni e per determinare così quali valori sono più adatti per le condizioni adottate (*Trial&Error*). Gli svantaggi principali di questo procedimento sono legati al fatto che i due parametri rimangono costanti durante tutto il processo, per cui non ne seguono la dinamica, e risulta dispendioso condurre numerosi esperimenti per la costruzione della mappa, sia nel caso si impieghino modelli matematici, sia nel caso in cui essa viene determinata sperimentalmente;
- Adottando un **modello matematico**: in questo caso i risultati ottenuti risultano dipendenti dai parametri utilizzati, spesso sconosciuti e quindi approssimati con un certo grado di incertezza, e dalle semplificazioni adottate per la costruzione del modello stesso (come nel caso del monodimensionale, in cui i gradienti lungo la direzione radiale non vengono considerati). Anche in questo caso è richiesta una campagna sperimentale abbastanza estesa per la convalida del modello;
- Utilizzando una **logica di controllo** che modifica durante il processo stesso la variabile (o le variabili) considerate; essa permette di seguire la dinamica del processo e di stabilire gli effetti dei parametri nelle diverse fasi, ottimizzando il processo più velocemente e in maniera più efficace, senza necessità di numerosi esperimenti. Lo svantaggio principale è rappresentato dalla difficoltà, ancora attuale, nel disporre di sistemi di monitoraggio accurati.

Il *design space* e i modelli matematici vengono classificati come procedure di ottimizzazione *off-line*, mentre la logica di controllo è un metodo *in-line*.

Una valida alternativa ai classici metodi *in-line* è rappresentata dall'uso della **logica fuzzy**: la sua implementazione è semplice, non necessita di strumenti di misura particolarmente accurati e non è basata su modelli matematici del processo, per cui non richiede un calcolo *in-line* di parametri (Viktorov V. and Colombo F., 2016).

Essa è stata utilizzata per esempio da Fissore et al., 2016, per l'ottimizzazione del processo di liofilizzazione di un prodotto farmaceutico: si è misurata la temperatura del prodotto e la velocità di riscaldamento dello stesso, e da esse si sono ottenuti i valori di T_{fluid} e P_c per massimizzare il flusso di sublimazione senza la denaturazione del prodotto, ovvero mantenendo il prodotto al di sotto del valore critico da non superare.

L'unico svantaggio che presenta tale approccio è che dipende fortemente dall'esperienza: il sistema *fuzzy* deve essere costruito sulla base della conoscenza del processo che si vuole controllare, utilizzando l'intuito nello stabilire gli accoppiamenti causa-conseguenza oppure deducendone le regole attraverso lo studio dei dati sperimentali a disposizione (Viktorov V. and Colombo F., 2016).

1.3.1 Principi di logica *fuzzy*

La logica *fuzzy* è stata introdotta da Zadeh L.A. con l'articolo "Fuzzy Sets" pubblicato nel 1965: deriva dalla teoria dei sistemi e si basa sull'espressione di un certo grado di appartenenza di un'affermazione ad un insieme di verità o falsità, contrariamente alla logica tradizionale che invece offre come uniche possibilità l'appartenenza totale o la non appartenenza. La parola

fuzzy viene letteralmente tradotta come “sfumato”, ad indicare la presenza di “sfumature” negli enunciati e la perdita di rigidità rispetto alla logica binaria. Attraverso questo tipo di logica si può creare un modello basato su regole linguistiche del tipo *if-then*, la cui definizione si basa principalmente sull’esperienza di chi le formula.

L’utilizzo dei modelli di questo genere e di quelli di tipo *black-box* è differente, poiché nel primo caso si ha conoscenza sperimentale del processo studiato, mentre nel secondo non si conoscono i fenomeni che intervengono all’interno del processo e si hanno a disposizione solo i dati input-output (Abonyi, 2003); inoltre, mentre i *fuzzy* sono di tipo qualitativo, i *black-box* sono classificati come modelli matematici veri e propri.

Per realizzare un modello *fuzzy*, si creano delle classi di appartenenza o *fuzzy sets* e delle funzioni di appartenenza o *membership functions* che definiscono quanto un certo input appartiene alla classe considerata attribuendogli un valore tra 0 e 1; ogni *fuzzy set* viene solitamente indicato tramite una *label*, ovvero un’etichetta rappresentante il suo significato linguistico (“basso”, “medio”, “alto”...). Le funzioni di appartenenza possono essere di diversi tipi: triangolari, trapezoidali, gaussiane, a campana, sinusoidali; alcuni esempi sono rappresentati nella figura 1.4:

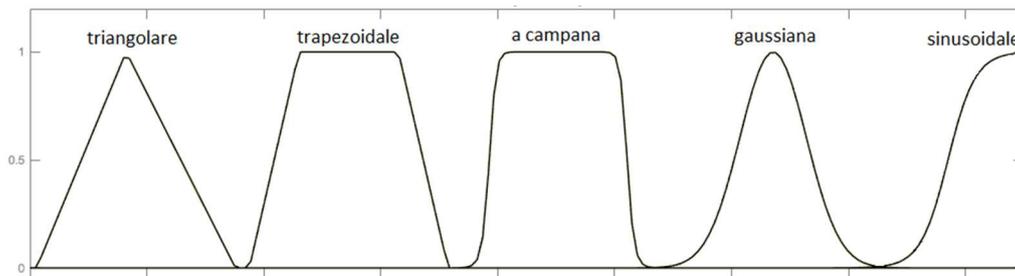


Figura 1.4 Rappresentazione di alcuni tipi di *membership functions*, ottenuta tramite il Fuzzy Toolbox di Matlab.

La loro scelta è importante in quanto esse vengono utilizzate per la trasformazione dei valori reali misurati degli input in valori *fuzzy*: questa operazione viene definita fuzzificazione. Dopo la fuzzificazione segue l’applicazione delle regole *if-then* stabilite, da cui si ottiene il valore *fuzzy* dell’output; nel Fuzzy Logic Toolbox di Matlab esso può essere calcolato tramite due diversi metodi di inferenza:

- Il metodo di Mamdani prevede un singolo valore *fuzzy* di output, in quanto aggrega il *fuzzy set* all’uscita;
- Il metodo di Sugeno fornisce invece più valori in uscita, relativi alle singole funzioni di appartenenza definite per l’output.

Le operazioni fra *fuzzy sets* che vengono utilizzate per la definizione delle regole sono del tipo unione, intersezione o complemento, e sono applicate rispettivamente tramite gli operatori logici OR, AND e NOT.

Ottenuti i valori di output viene infine applicata la defuzzificazione, ovvero la loro trasformazione in valori reali; anche nel caso della defuzzificazione si può ricorrere a diversi metodi, come il metodo del centro di gravità COG o il metodo dei massimi, applicabile in diverse varianti:

- Il metodo COG consiste nel calcolo del baricentro dell’area sottesa al grado di appartenenza alla *membership function* dell’output, ottenuta tramite l’applicazione delle

regole; questo metodo è molto usato in quanto poco sensibile a eventuali variazioni nei valori di input;

- Nel metodo dei massimi si può invece considerare come valore reale di output il primo massimo della *membership function* dell'output (FOM, *First of Maximum*) oppure l'ultimo (LOM, *Last of Maximum*) o la media di questi due valori (MOM, *Middle of Maxima*).

Nella figura 1.5 è presente una schematizzazione del controllo *fuzzy* appena descritto:

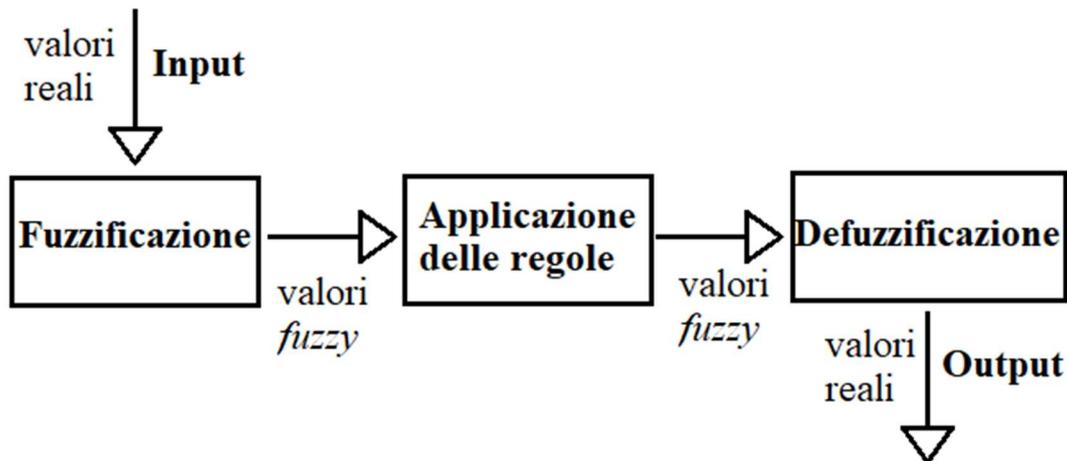


Figura 1.5 Schema di funzionamento di un sistema di controllo *fuzzy*.

1.4 Scopo del lavoro di Tesi

Il presente lavoro di Tesi è stato suddiviso in due parti:

- Nella prima parte è stata indagata la possibilità di utilizzare il MicroFD per la simulazione del comportamento dei flaconi esterni o laterali di un liofilizzatore in scala pilota, attraverso la manipolazione della temperatura dell'anello di cui è dotato. Lo studio è stato condotto in entrambe le apparecchiature utilizzando soluzioni acquose di saccarosio a diverse concentrazioni e con varie condizioni di temperatura del ripiano e pressione della camera; sono stati ricavati i due parametri K_v e R_p del modello matematico monodimensionale per ogni combinazione di condizioni operative, per poi effettuare il confronto tra i loro valori e tra i profili termici del prodotto ottenuti per i flaconi del MicroFD e quelli laterali del liofilizzatore REVO. I dati ottenuti sono stati comparati con quelli di analisi precedenti incentrate sulla simulazione dei flaconi centrali. Sono stati effettuati esperimenti sia con i flaconi 20R che con quelli 6R; nel caso dei 6R sono stati realizzati nel REVO batch di differenti dimensioni, per simulare diverse condizioni di carico.
- Nella seconda parte è stato progettato un controllore di tipo *fuzzy* da implementare nel MicroFD per il mantenimento dell'omogeneità del batch di flaconi 20R, con lo scopo futuro di eliminare dalla procedura *Trial&Error* la variabile relativa all'*offset* ottimale

da impostare nel *LyoSim* e ridurre quindi la quantità di esperimenti da effettuare durante lo studio della fase dell'essiccamento primario nel MicroFD; in questo stadio, soprattutto nella parte iniziale, la temperatura del prodotto tende a salire rapidamente, con la creazione di una certa differenza di temperatura tra il flacone centrale e quelli esterni. È stato condotto un primo studio empirico della dinamica del processo per l'individuazione degli input del sistema di controllo (ovvero la differenza di temperatura del prodotto tra il flacone centrale e quella media dei flaconi esterni e la velocità di riscaldamento del prodotto) e dell'output (ovvero la differenza tra la temperatura dell'anello finale e iniziale rispetto al Δt stabilito); sono state create le *membership functions* e le regole *if-then* attraverso l'uso del toolbox di Matlab Fuzzy Logic Designer; infine è stato prodotto uno script Matlab con l'obiettivo di trasformare l'output ottenuto in un comando inseribile nell'interfaccia del MicroFD, ovvero in un *offset* calcolato tra la temperatura dell'anello e la temperatura media del prodotto. Il sistema di controllo così ottenuto è stato implementato in diverse condizioni di temperatura del ripiano e pressione della camera.

Nel Capitolo 2 viene presentata la descrizione del MicroFD, del REVO e delle tecniche sperimentali utilizzate, nonché la costruzione dell'algoritmo *fuzzy* utilizzato per la seconda parte del lavoro.

Nel Capitolo 3 sono presentati e discussi i risultati delle prove sperimentali effettuate.

2. Apparecchiature di laboratorio e metodologie

Per la prima parte del lavoro sono stati utilizzati sia il MicroFD che il REVO, entrambi realizzati dalla MillRock Technology; nella seconda parte del lavoro è stato utilizzato solo il MicroFD.

Di seguito viene riportata la descrizione della struttura delle due apparecchiature utilizzate e della loro interfaccia utente.

2.1 MicroFD

Questo liofilizzatore ha dimensioni ridotte rispetto a quelli solitamente utilizzati in laboratorio: occupa un volume di 76.2 x 50.8 x 170.2 cm. In figura 2.1 è visibile il suo esterno:



Figura 2.1 Esterno del MicroFD. Figura tratta dal sito della *MillRock Technologies*.

La camera di liofilizzazione è accessibile dalla parte superiore, e al suo interno sono visibili il ripiano, *Accuflux* e *LyoSim*, come mostrato in figura 2.2:

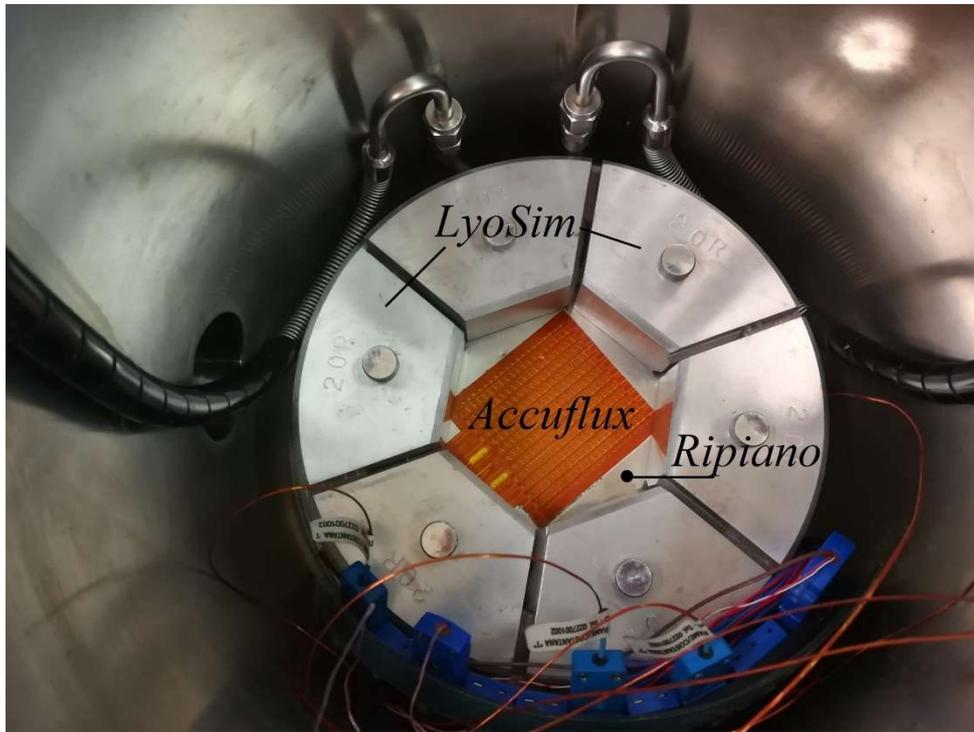


Figura 2.2 Camera di liofilizzazione del MicroFD.

A sinistra è visibile anche l'apertura attraverso cui il vapore uscente dal prodotto durante l'essiccamento esce dalla camera, per passare in un condotto di collegamento con il condensatore, posto esternamente e dotato di valvola di isolamento; il fluido refrigerante passante all'interno della serpentina costituente il condensatore ha una temperatura di circa -70°C .

In basso invece è visibile il sistema di collegamento delle termocoppie, che possono essere al massimo 8; le termocoppie utilizzate sono in rame-costantina, di tipo T.

Il ripiano è circolare e ha un diametro di 6'' (15.24 cm); sopra di esso è posto il dispositivo *Accuflux*, il quale è in grado di rilevare il flusso termico tra il ripiano e i flaconi e permette al MicroFD di calcolare il $K_{v,shelf}$, che corrisponde al termine del K_v totale relativo al solo scambio tra il ripiano e il fondo del flacone (il procedimento di calcolo è illustrato nel paragrafo 2.2).

Il *LyoSim* è un anello metallico costituito da 6 componenti, le cui dimensioni cambiano a seconda del tipo di flaconi che si vuole utilizzare per la prova (20R o 6R): le sue parti vengono montate in maniera tale da formare uno spazio esagonale centrale, in cui vengono posizionati i flaconi; quelli esterni sono a diretto contatto con l'anello. All'interno di ogni componente del *LyoSim* e nel ripiano scorre lo stesso fluido, la cui temperatura può variare tra -60°C e $+60^{\circ}\text{C}$, ma ripiano e *LyoSim* sono collegati a due sistemi di refrigerazione/riscaldamento indipendenti; la temperatura dell'anello può essere impostata solo come *offset* rispetto alla temperatura del prodotto o a quella del ripiano: l'*offset* può variare tra -15°C e $+15^{\circ}\text{C}$.

La camera viene chiusa tramite un coperchio a pistone; una guarnizione in silicone è posta tra l'apparecchiatura e il pistone per mantenere meglio il sottovuoto. Nella parte interna del coperchio scorre lo stesso fluido del ripiano e dell'anello, per simulare la presenza di un ripiano superiore e migliorare quindi la riproduzione delle condizioni normalmente presenti in un liofilizzatore di dimensioni usuali.

È presente infine la pompa da vuoto, che può raggiungere condizioni di vuoto molto spinto; all'interno della camera la pressione viene misurata sia attraverso un manometro di tipo Pirani che attraverso uno di tipo capacitivo (MKS Baratron): come già descritto nel paragrafo 1.1, il rapporto tra le due misure viene utilizzato per la determinazione della fine dell'essiccamento primario.

2.1.1 LyoPAT

LyoPAT è l'interfaccia attraverso la quale è possibile monitorare e controllare il processo di liofilizzazione all'interno del MicroFD; essa è mostrata nella figura 2.3:

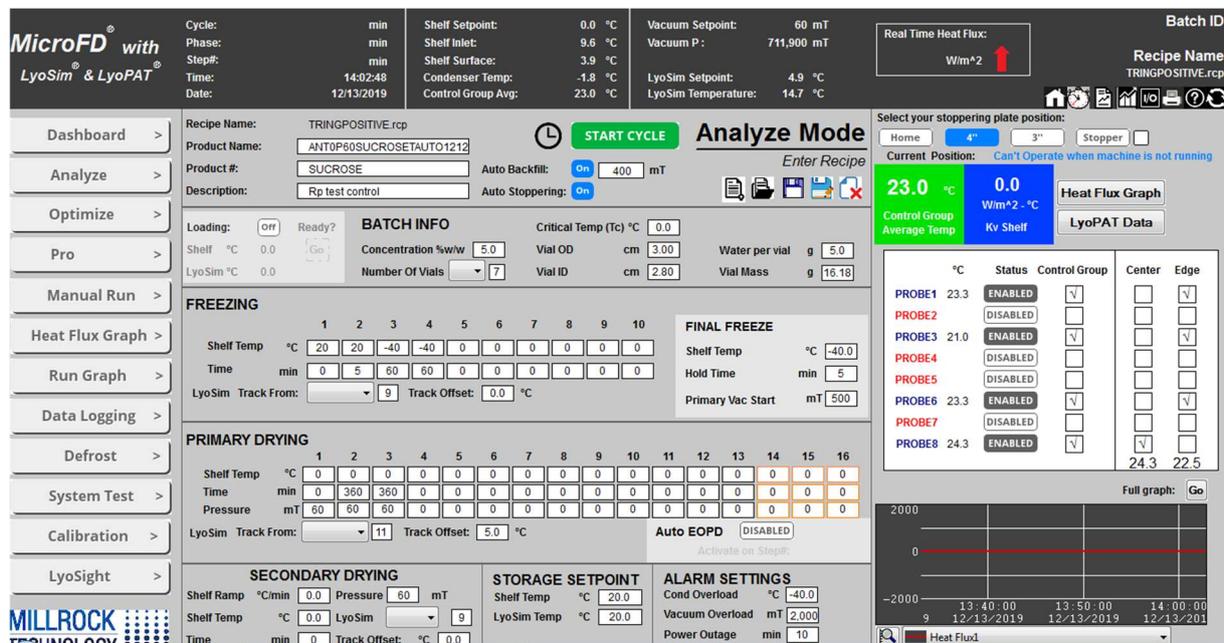


Figura 2.3 Interfaccia LyoPAT visibile nella modalità Analyze.

Nella parte sinistra dell'interfaccia è possibile:

- Scegliere la modalità di lavoro: *Analyze*, *Optimize*, *Pro Mode* o *Manual Run*;
- Visualizzare i grafici relativi ai profili di temperatura e pressione, nonché quello relativo al flusso di calore misurato dall'*Accuflux*;
- Impostare, alla fine di una prova, il *Defrost* o sbrinamento del condensatore.

Nella parte alta sono riportate le informazioni in tempo reale dei *setpoint* e dei valori effettivi della temperatura del fluido entrante nel ripiano, della superficie del ripiano, del condensatore, del prodotto presente nel gruppo di controllo e dell'anello, nonché la pressione all'interno della camera, sia quella rilevata dal Pirani (sempre visibile in tutte le fasi) che quella rilevata dal

Baratron (visibile solo dopo l'inizio dell'essiccamento primario). Inoltre, è visibile anche il flusso di calore in W/m^2 misurato dall'*Accuflux*.

Nella parte destra sono visualizzate le misure ottenute con le termocoppie impiegate durante la prova, e si possono selezionare quelle costituenti il gruppo di controllo; si può inoltre visualizzare il $K_{v,shelf}$ calcolato dal MicroFD in tempo reale.

La parte centrale varia in base alla modalità di lavoro selezionata: nella modalità *Analyze* è possibile inserire la ricetta relativa alla prova sperimentale da effettuare.

È presente una prima parte in cui inserire le informazioni relative al batch realizzato nella singola prova, come la concentrazione della soluzione utilizzata e il volume di riempimento, le dimensioni dei flaconi e il loro numero, e la temperatura critica del prodotto utilizzato.

Nella seconda parte vengono inserite le informazioni relative al congelamento, ovvero la temperatura del ripiano e i tempi di mantenimento di ogni temperatura. Inserire un tempo nullo significa indicare alla macchina di arrivare alla temperatura impostata nel minor tempo possibile; la durata di ogni fase viene stabilita in base alla velocità di raffreddamento che si vuole impiegare per effettuare il congelamento. È possibile inoltre inserire l'*offset* desiderato per il *LyoSim*, ovvero la differenza della temperatura dell'anello rispetto a quella media del prodotto, o a quella rilevata da una singola termocoppia, oppure a quella del ripiano. Sulla destra si inseriscono le condizioni di temperatura del ripiano, tempo di mantenimento e pressione iniziale di vuoto relative alla fase finale del congelamento.

Nella terza parte vengono inserite le informazioni sull'essiccamento primario, ovvero la pressione nella camera, la temperatura del ripiano e le durate relative ad ogni impostazione, nonché l'*offset* attraverso cui stabilire la temperatura del *LyoSim*. Si può anche selezionare la modalità di chiusura automatica dei flaconi alla fine delle operazioni.

Nella parte finale si impostano le condizioni relative all'essiccamento secondario e al *setpoint* di conservazione: mentre per il congelamento e per l'essiccamento primario è possibile impostare più step con diverse condizioni operative, per l'essiccamento secondario è prevista una sola fase di cui è possibile definire la velocità di riscaldamento del ripiano, la pressione, la temperatura del ripiano, la durata e l'*offset* dell'anello. Sulla destra si possono inserire i valori di criticità a cui è associato un allarme.

Nel presente lavoro di Tesi è stata utilizzata la stessa ricetta per il congelamento in tutte le prove, mostrata in figura 2.4: inizialmente si impone il raggiungimento nel tempo minore possibile ($t=0$) di una temperatura pari a $20^{\circ}C$ nel ripiano, mantenuta per 5 minuti; si imposta poi una fase di raffreddamento a $-40^{\circ}C$ della durata di 60 minuti, e un mantenimento di tale temperatura per un'altra ora; la fase finale prevede il mantenimento della stessa temperatura per ulteriori 5 minuti e poi la pressione si porta a 500 mTorr. Le condizioni impostate implicano una velocità di raffreddamento di $1^{\circ}C/min$; l'*offset* del *LyoSim* è sempre stato mantenuto nullo rispetto alla temperatura media del prodotto.

Le condizioni dell'essiccamento primario sono invece state variate per ogni tipologia di prova; l'*offset* del *LyoSim* è sempre stato impostato rispetto alla temperatura media del prodotto. In nessun esperimento è stato effettuato l'essiccamento secondario, in quanto fase di non interesse per il presente lavoro.

FREEZING											FINAL FREEZE		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Shelf Temp °C	20	20	-40	-40	0	0	0	0	0	0	Shelf Temp °C	-40.0	
Time min	0	5	60	60	0	0	0	0	0	0	Hold Time min	5	
LyoSim Track From:	▼		9	Track Offset:		0.0	°C				Primary Vac Start mT	500	

Figura 2.4 Ricetta impostata per il congelamento.

2.2 REVO

Il REVO è un liofilizzatore in scala pilota, utilizzato per lo studio del processo di liofilizzazione per lo *scale-up* a livello industriale; le sue dimensioni sono decisamente maggiori rispetto a quelle del MicroFD (88,9 x 116,8 x 190,5 cm). In figura 2.5 è visibile il suo esterno:



Figura 2.5 Esterno del REVO. Figura tratta dal sito della *MillRock Technologies*.

In basso è visibile la serpentina costituente il condensatore, la cui temperatura può arrivare sino a -85°C .

In alto è visibile la camera di liofilizzazione, all'interno della quale sono presenti 5 ripiani, ognuno di dimensioni $30,5 \times 61 \text{ cm}$; all'interno di ogni ripiano scorre un fluido la cui temperatura può andare da -70°C a $+65^{\circ}\text{C}$.

Nella parte più alta della camera è presente il sistema con le termocoppie: esse possono essere al massimo 10, e sono state utilizzate termocoppie in rame-costantana, di tipo T.

L'interfaccia di monitoraggio e gestione del REVO, *Opti-Dry*, è molto simile al *LyoPAT*, descritto nel paragrafo 2.1.1; essa è visibile in figura 2.6.

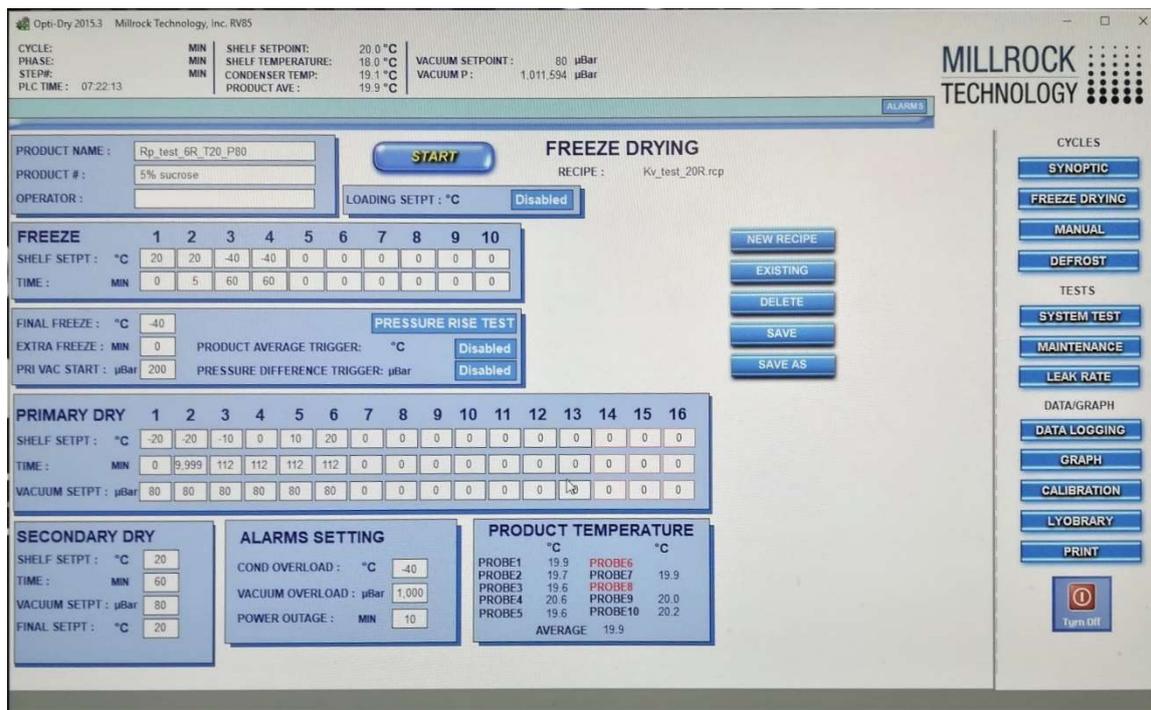


Figura 2.6 Interfaccia *Opti-Dry* utilizzata per la gestione del REVO.

Come osservabile in figura, le sezioni dedicate all'inserimento della ricetta sono identiche; in questo caso non è naturalmente presente il *Track Offset*, non essendo presente il *LyoSim*. In questa apparecchiatura è possibile effettuare il *Pressure Rise Test*, metodologia per la determinazione della durata dell'essiccamento primario presentata nel paragrafo 1.1.1, non utilizzata nel presente lavoro di Tesi.

2.3 Calcolo del coefficiente di scambio termico K_v

Il MicroFD, come già mostrato precedentemente, calcola il termine K_v relativo allo scambio di calore tra il ripiano e il flacone a partire dal valore del flusso termico ricevuto dai flaconi per tramite del ripiano riscaldante e misurato mediante *Accuflux* attraverso l'equazione

$$K_{v,shelf} = \frac{J_{q,shelf}}{T_{shelf}-T_b} \quad (2.1)$$

Per calcolare il $K_{v,tot}$ si determina qual è la percentuale di calore scambiato attraverso il ripiano rispetto a quello totale. Tale calcolo può essere fatto al termine del processo, considerando che il calore totale fornito al prodotto è pari a quello che serve a far sublimare completamente l'acqua in esso contenuto, il cui calcolo è mostrato nell'equazione 2.2:

$$\%Q_{shelf} = \frac{\int_0^{\Delta t, prim} J_{q,shelf} dt}{\Delta H_s \cdot \Delta m} \quad (2.2)$$

Infine, facendo il rapporto tra $K_{v,shelf}$ e $\%Q_{shelf}$, si ottiene il $K_{v,tot}$ relativo a tutto il calore scambiato durante il processo:

$$K_v = \frac{K_{v,shelf}}{\%Q_{shelf}} \quad (2.3)$$

In ogni prova relativa alla prima parte del lavoro è però stato considerato il modello monodimensionale del processo, presentato nel paragrafo 1.1, ed è stato calcolato il K_v gravimetrico attraverso l'equazione 2.4:

$$K_v = \frac{\Delta m \Delta H_s}{A_v \int_0^{\Delta t, prim} (T_{fluid} - T_b)} \quad (2.4)$$

dove la variazione di massa corrisponde alla differenza di peso dei flaconi prima e dopo la prova, il valore dell'area di scambio dipende dal tipo di flacone utilizzato (20R o 6R) e l'integrale della differenza di temperatura tra ripiano e prodotto è riferito alla durata dell'essiccamento primario nella prova, solitamente pari a 4h nel presente lavoro di Tesi: per il calcolo del K_v gravimetrico è infatti necessario che la temperatura delle termocoppie non abbia ancora cominciato a salire come accadrebbe qualora tutto il ghiaccio fosse sublimato, poiché ciò renderebbe inutile la prova.

La misura del K_v non dipende dalla natura del prodotto trattato, quindi il suo valore non varia al variare della composizione della soluzione trattata a parità di tutte le altre condizioni (dimensioni e materiale del flacone, pressione nella camera, temperatura del ripiano); il suo valore dipende soprattutto dalla pressione della camera (Fissore, 2013).

2.4 Calcolo della resistenza al flusso di vapore R_p

Successivamente all'ottenimento del valore del K_v gravimetrico si effettuano degli ulteriori test, nelle stesse condizioni dei precedenti, in cui l'essiccamento primario viene portato a termine; attraverso l'equazione 1.3 si ottiene il valore del flusso termico J_q , il quale è legato al flusso di sublimazione J_w attraverso il bilancio di energia, espresso dall'equazione 1.1.

La resistenza R_p è quindi calcolata tramite l'equazione 2.5, che deriva semplicemente da una manipolazione dell'equazione 1.4:

$$R_p = \frac{P_{w,i} - P_{w,c}}{J_w} \quad (2.5)$$

dove la pressione di vapore $p_{w,c}$ è approssimabile alla pressione impostata nelle singole prove, essendo l'atmosfera in camera composta quasi esclusivamente da acqua, mentre quella all'interfaccia $p_{w,i}$ è una funzione della temperatura del prodotto all'interfaccia (assunta pari a quella misurata sul fondo del flacone tramite una termocoppia) e può essere calcolata per esempio tramite l'equazione empirica di Groff-Gratch (Fissore, 2017). Ricordando l'espressione del bilancio di massa (equazione 1.2) si nota che la resistenza al flusso di vapore

dipende dalla variazione nel tempo dello spessore dello strato secco: per questo motivo, i risultati sperimentali relativi a questo parametro vengono riportati nel presente lavoro di Tesi sotto forma di grafici rappresentanti l'andamento di R_p in funzione di L_{dried} , calcolati per ogni flacone in cui è presente una termocoppia.

2.5 Metodologie sperimentali

Le prove sperimentali sono state condotte utilizzando acqua purificata tramite il deionizzatore modello ELGA Vision 250 realizzato dalla Veolia per i test di K_v gravimetrico, e soluzioni acquose al 5% in peso di saccarosio prodotto dalla Sigma Aldrich ($\geq 99\%$) e utilizzato tale e quale, per le prove relative alla misurazione del coefficiente R_p e per quelle relative alla parte di controllo con logica *fuzzy*.

I flaconi utilizzati sono del tipo 6R tubolare e 20R tubolare, e sono stati utilizzati degli *stopper* per la chiusura, ovvero degli appositi tappi che lasciano uno spazio aperto per la fuoriuscita del vapore; nei flaconi in cui è stata inserita una termocoppia, sono stati utilizzati degli specifici *stopper* per mantenerla in posizione, in modo che tocchi il fondo del flacone nella parte centrale. Flaconi e stoppers sono visibili nella figura 2.7:



Figura 2.7 A sinistra: flacone 20R con soluzione acquosa e stopper; al centro: flacone 20R con soluzione acquosa e termocoppia; a destra: flacone 6R con prodotto liofilizzato.

Per le prove effettuate nel MicroFD con i flaconi 6R sono state posizionate 6 termocoppie, 2 in flaconi interni e 4 in quelli esterni: sono state messe più termocoppie nei flaconi esterni che in quelli interni in modo da avere a disposizione più profili di temperatura relativi ai flaconi in questa posizione, per fare successivamente un confronto sia tra i profili dei flaconi esterni del MicroFD e di quelli esterni del REVO, sia tra quelli centrali del MicroFD e quelli esterni del REVO. In figura 2.8 è presentata la raffigurazione della disposizione dei flaconi 6R e la distinzione tra interni ed esterni, dove per esterni si intendono solo quelli dell'ultima fila.

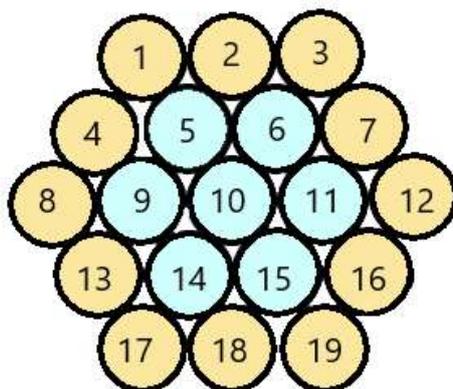


Figura 2.8 Disposizione dei flaconi 6R nel MicroFD; in azzurro i flaconi interni, in giallo quelli esterni.

Per le prove effettuate nel MicroFD con i flaconi 20R sono state usate 4 termocoppie, una nel flacone interno (l'unico presente) e 3 in quelli esterni; la disposizione dei flaconi è presentata in figura 2.9:

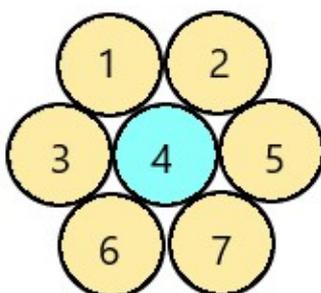


Figura 2.9 Disposizione dei flaconi 20R nel MicroFD.

Anche per effettuare i test nel REVO sono state utilizzate termocoppie posizionate sia nei flaconi centrali sia in quelli laterali, per una visione completa del processo; si considerano laterali solo quelli della fila più esterna.

In figura 2.10 si riporta la disposizione dei flaconi 6R nei due differenti batch studiati nel REVO, mentre in figura 2.11 è rappresentata quella utilizzata con i flaconi 20R.

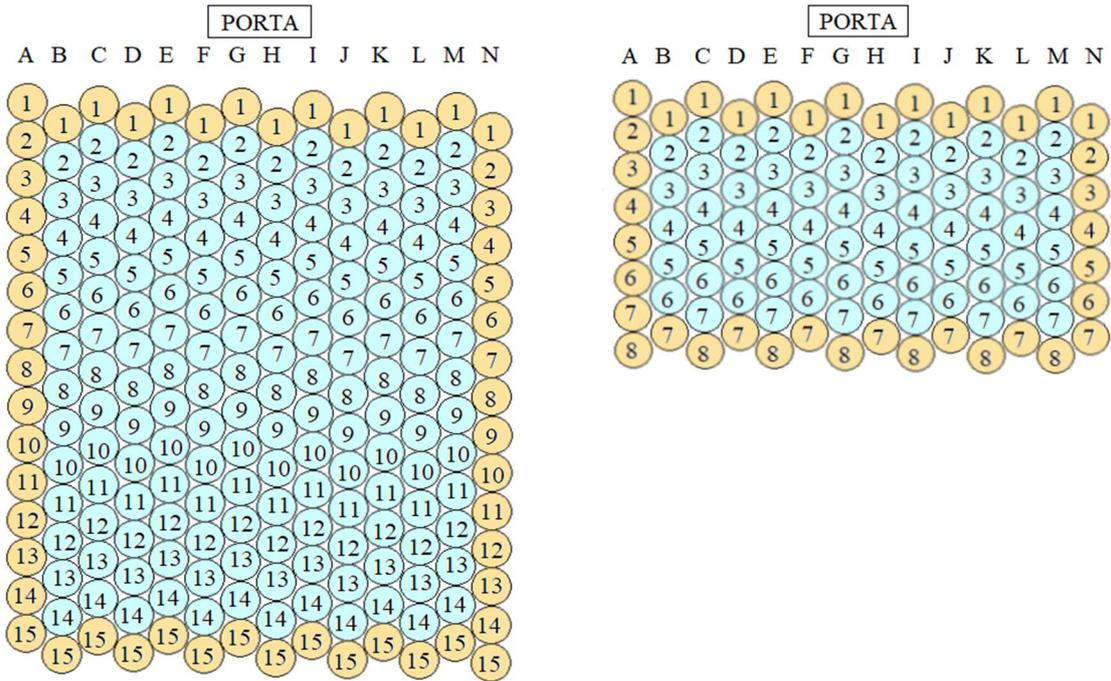


Figura 2.10 Disposizione dei flaconi 6R nel liofilizzatore REVO; in azzurro i flaconi interni, in giallo quelli esterni. A sinistra batch grande con 210 flaconi, a destra batch medio con 105 flaconi.

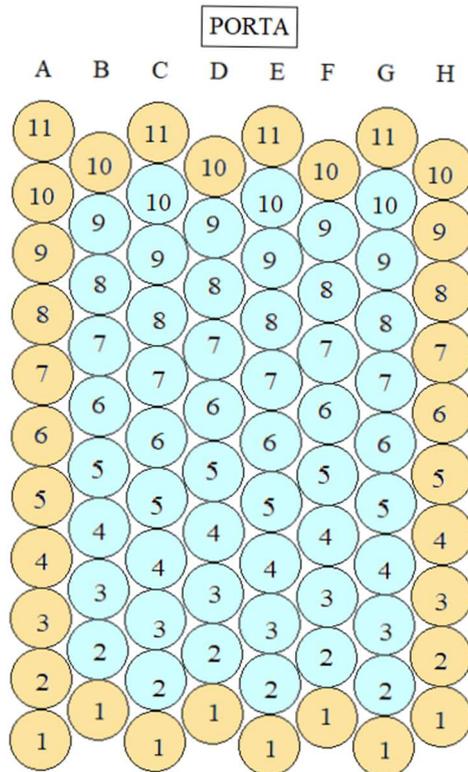


Figura 2.11 Disposizione dei flaconi 20R nel liofilizzatore REVO; in azzurro i flaconi interni, in giallo quelli esterni.

2.5.1 Prove sperimentali

Sono state effettuate diverse prove sperimentali con il fine di simulare la dinamica dei flaconi in un liofilizzatore in scala pilota, il REVO, tramite l'utilizzo del MicroFD; in figura 2.12 è riportato uno schema dei test svolti.

Flaconi 6R	Flaconi 20R
MicroFD: <i>K_v</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, <i>offset</i> : +1°C, +5°C, +10°C, +15°C, acqua <i>R_p</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, <i>offset</i> : +10°C, 5% w/w saccarosio	MicroFD: <i>K_v</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, <i>offset</i> : +3°C, +5°C, +7°C, acqua <i>R_p</i> : <i>T_{shelf}</i> = 0°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, <i>offset</i> : +5°C, 5% w/w saccarosio
REVO: batch 210 flaconi e batch 105 flaconi <i>K_v</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, acqua <i>R_p</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, 5% w/w saccarosio	REVO: batch 84 flaconi <i>K_v</i> : <i>T_{shelf}</i> = -20°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, acqua <i>R_p</i> : <i>T_{shelf}</i> = 0°C, <i>P_c</i> = 60 mTorr, 5% w/w saccarosio

Figura 2.12 Schema delle prove effettuate nella prima parte del lavoro di Tesi.

Sono stati utilizzati in un primo momento i flaconi 6R. Sono stati realizzati 2 test nel REVO con temperatura del ripiano pari a -20°C e pressione nella camera pari a 60 mTorr, con batch di differenti dimensioni: uno di carico completo del ripiano contenente 210 flaconi, definito **grande**, e uno di carico parziale contenente 105 flaconi, definito **medio**. Successivamente sono stati realizzati 4 test nelle stesse condizioni di temperatura del ripiano e pressione della camera con *offset* del *LyoSim* positivi, con valore diverso in ogni test (+1°C, +5°C, +10°C, +15°C), al fine di simulare il comportamento dei flaconi laterali. Tutte le prove sono state realizzate con acqua, in quanto l'obiettivo finale era lo studio della determinazione del parametro *K_v* gravimetrico medio e di quello relativo ai singoli flaconi, per poter confrontare le condizioni ottenute nel REVO con quelle ottenute nel MicroFD. Al fine di ottenere un profilo completo della situazione di ogni flacone nei due batch, sono stati considerati dei test effettuati precedentemente a questo lavoro di Tesi, con *offset* negativi per la simulazione dei flaconi centrali (-7°C, -5°C, -3°C, -1°C).

Una volta individuato l'*offset* ottimale del *LyoSim* per la simulazione dei flaconi laterali, sono stati effettuati due ulteriori test nel REVO con una soluzione acquosa al 5% in peso di saccarosio, nei due batch di differenti dimensioni, e un test nel MicroFD nelle stesse condizioni e con la stessa soluzione: in tutti i casi si è arrivati al termine dell'essiccamento primario, ed è stato determinato il parametro *R_p*. Per il confronto tra i profili della resistenza al flusso di sublimazione nello strato secco è stato utilizzato anche un test con *offset* negativo, realizzato precedentemente.

La stessa analisi sperimentale è stata effettuata sui flaconi 20R: in questo caso è stata impostata una temperatura del ripiano pari a -20°C e una pressione della camera pari a 60mTorr, variando

l'offset (+3°C, +5°C, +7°C), nei test con la finalità di determinare il parametro K_v gravimetrico medio; una volta determinato l'offset ottimale, è stata svolta una prova con essiccamento primario completo per la determinazione del parametro R_p , utilizzando una temperatura del ripiano pari a 0°C, una pressione della camera pari a 60 mTorr e una soluzione acquosa al 5% in peso di saccarosio. Per la simulazione dei flaconi centrali sono stati utilizzati dei test con offset negativo (-5°C, -3°C, -1°C) realizzati precedentemente.

In tutte le prove effettuate, le misure considerate sono la perdita di massa relativa ai singoli flaconi e i profili di temperatura del prodotto, utilizzate per il calcolo della deviazione standard nel batch, per il calcolo gravimetrico del K_v di ogni flacone e quello medio totale, medio dei flaconi interni e medio dei flaconi esterni, e per il calcolo del parametro R_p in funzione dello spessore dello strato secco L_{dried} .

2.5.2 Preparazione dei campioni

La sequenza di operazioni svolte per ogni prova è stata variata in base all'obiettivo del test.

Per le prove volte all'ottenimento del parametro K_v :

- Riempimento dei flaconi con acqua purificata mediante pipetta *Eppendorf Multipette® plus*, con volumi diversi a seconda del tipo di flacone utilizzato:
 1. Fiale 6R: 6 ml;
 2. Fiale 20R: 10 ml;
- Pesatura dei flaconi mediante bilancia digitale *Mettler Toledo, modello MS204S/0*;
- Posizionamento degli *stopper* e delle termocoppie, facendo in modo che il punto di contatto tra l'estremità della termocoppia (parte responsabile della misura) e il fondo del flacone sia centrale;
- Posizionamento dei flaconi nella camera e chiusura della camera stessa;
- Avvio della prova e raccolta dei dati;
- Alla fine della prova, prelievamento dei flaconi dalla camera;
- Pesatura dei flaconi.

La pesatura dei flaconi prima e dopo la prova è finalizzata al calcolo del K_v gravimetrico tramite l'equazione 2.4, ma anche alla verifica dell'ottenimento di un batch omogeneo.

Per le prove volte all'ottenimento del parametro R_p :

- Preparazione della soluzione acquosa di saccarosio al 5% in peso, mediante l'ausilio dell'agitatore *Medline MS200*;
- Riempimento dei flaconi con la soluzione mediante pipetta *Eppendorf Multipette® plus*, con volumi diversi a seconda del tipo di flacone utilizzato:
 3. Fiale 6R: 3 ml;
 4. Fiale 20R: 5 ml;
- Pesatura dei flaconi mediante bilancia digitale *Mettler Toledo, modello MS204S/0*: la pesatura in questo caso viene fatta per verificare che tra i flaconi ci sia una bassa deviazione standard iniziale;
- Posizionamento degli *stopper* e delle termocoppie, facendo in modo che il punto di contatto tra l'estremità della termocoppia (parte responsabile della misura) e il fondo del flacone sia centrale;
- Posizionamento dei flaconi nella camera e chiusura della camera stessa;
- Avvio della prova e raccolta dei dati;

- Alla fine della prova, prelievamento dei flaconi dalla camera.

Nelle prove finalizzate al calcolo del K_v gravimetrico, il volume di riempimento dei flaconi è stato raddoppiato rispetto a quello utilizzato nelle prove per la determinazione del parametro R_p per evitare di completare la sublimazione del ghiaccio nell'intervallo di tempo per il quale è stato condotto il test.

Nei test effettuati nel REVO, i flaconi sono stati posizionati sul ripiano mediante l'utilizzo di un vassoio e di una cornice; la cornice è poi stata rimossa, per evitare un aumento dell'effetto di bordo legato all'irraggiamento proveniente dalla cornice stessa.

2.6 Sistema di controllo *fuzzy*

2.6.1 Variabili e funzioni di appartenenza

È stato costruito un sistema di controllo *fuzzy* tramite il ToolBox Fuzzy Logic di Matlab; gli input e gli output sono stati individuati tramite una prima prova sperimentale, volta alla migliore comprensione della dinamica del processo di essiccamento primario.

Sono stati individuati 2 diversi tipi di input: la differenza tra la temperatura rilevata nel flacone interno e quella media rilevata nei 3 flaconi esterni monitorati, $T_{int} - T_{avg,ext}$, e la velocità di riscaldamento del prodotto, Q_R , calcolata tramite il rapporto della variazione di temperatura media totale del prodotto nell'intervallo di tempo (ovvero considerando sia il flacone interno che quelli esterni) e l'intervallo di tempo scelto per l'applicazione dell'output restituito dal programma, pari a 10 minuti.

È stato individuato un solo output, ovvero la differenza tra la temperatura finale desiderata e quella iniziale effettiva, rispetto all'intervallo di tempo, dell'anello *LyoSim*, ΔT_{ring} ; questo output è stato poi trasformato in un *offset* tra la temperatura del prodotto media totale e quella dell'anello, tramite le seguenti relazioni:

$$T_{ring,fin} = T_{ring,in} + \Delta T_{ring} \quad (2.6)$$

$$offset = T_{ring,fin} - T_{avg} \quad (2.7)$$

Nella figura 2.13 è rappresentato lo schema del sistema *fuzzy* realizzato:

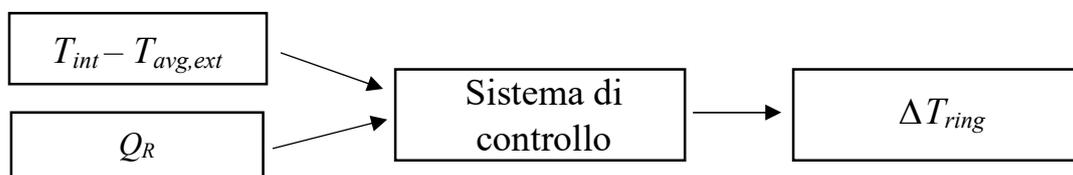


Figura 2.13 Schema del sistema di controllo *fuzzy*.

L'*offset* è positivo se $T_{int} - T_{avg,ext}$ ha un valore positivo, ovvero se il flacone interno ha un prodotto a temperatura maggiore rispetto ai flaconi esterni, mentre è negativo se la differenza è negativa. La velocità di riscaldamento dovrebbe essere sempre positiva poiché durante l'essiccamento primario si attua un riscaldamento: in rari casi risulta essere negativa, come se il prodotto si stesse raffreddando; tuttavia i valori negativi individuati sono molto piccoli,

prossimi allo zero, e possono essere dovuti all'incertezza intrinseca legata all'uso delle termocoppie come strumenti di misura.

Di seguito, nella tabella 2.1, vengono riportati i range numerici di appartenenza dei valori relativi agli input e agli output e i *label* assegnati ad ogni variabile, nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia **positivo**:

Tabella 2.1 Range numerici di appartenenza delle variabili input e output nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia positivo.

Variabile input/output	Range numerico di appartenenza	di	<i>Label</i>
$T_{int} - T_{avg,ext}$	[0 2.5],	°C	bassa, media, alta
Q_R	[-0.0025 1],	°C/min	bassa, media, alta, molto alta
ΔT_{ring}	[0 3],	°C	bassa, media, alta

Per ognuna delle variabili sono state utilizzate due tipi di funzioni di appartenenza: le funzioni a campana e le sigmoidali. Queste due tipologie sono tra le più utilizzate in quanto sono non lineari e meno rigide rispetto alle triangolari e alle trapezoidali (Kaleel A. H. and Mallick Z, 2012). La *generalized bell function*, o funzione a campana, ha la seguente espressione (2.8):

$$f(x, a, b, c) = \frac{1}{\left(1 + \left|\frac{x-c}{a}\right|^{2b}\right)} \quad (2.8)$$

dove a definisce l'ampiezza della funzione, c definisce il centro del *plateau*, e b definisce la forma della curva andando a modificare la "ripidezza" della funzione ad entrambi i lati del *plateau* centrale.

Per le *label* estreme sono state utilizzate invece le funzioni di appartenenza sigmoidali, con le stesse caratteristiche di quelle a campana ma con la differenza che sono definite soltanto su un lato rispetto al punto individuato come centro; sono definite tramite la seguente espressione (2.9):

$$f(x, a, c) = \frac{1}{(1 + e^{-a(x-c)})} \quad (2.9)$$

dove a può essere positivo o negativo e definisce l'area di transizione della funzione, mentre c specifica la posizione del centro.

I parametri delle funzioni appena descritte sono stati scelti sulla base di una prova sperimentale precedentemente eseguita, ovvero i *fuzzy sets* sono stati definiti in modo da riprodurre verosimilmente i risultati ottenuti da un test in cui il controllo è stato effettuato manualmente, senza l'ausilio di algoritmi ma solo mediante l'uso della logica dell'operatore.

Nella tabella 2.2 sono riportati i valori di a , b e c utilizzati per definire ogni *label* delle variabili, adottati per il caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia **positivo**:

Tabella 2.2 Parametri associati ad ogni funzione scelta per le *label*, nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia positivo.

Variabile	Valore linguistico	Tipo funzione di appartenenza	a	b	c
$T_{int} - T_{avg,ext}$	bassa	sigmoideale	-27.7		0.3538
	media	a campana	0.6133	11.9	0.987
	alta	sigmoideale	30		1.617
Q_R	bassa	sigmoideale	-250		0.03933
	media	a campana	0.08629	10	0.129
	alta	a campana	0.08048	10	0.298
	molto alta	sigmoideale	250		0.3811
ΔT_{ring}	bassa	sigmoideale	-15.9		0.3486
	media	a campana	0.989	12.2	1.342
	alta	sigmoideale	21.8		2.347

Di seguito, nella tabella 2.3, vengono riportati i range numerici di appartenenza dei valori relativi agli input e agli output e i *label* assegnati ad ogni variabile, nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia **negativo**:

Tabella 2.3 Range numerici di appartenenza delle variabili input e output nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia negativo.

Variabile input/output	Range numerico di appartenenza	di	<i>Label</i>
$T_{int} - T_{avg,ext}$	[-2.5 0],	°C	bassa, media, alta
Q_R	[-0.0025 1],	°C/min	bassa, media, alta, molto alta
ΔT_{ring}	[-3 0],	°C	bassa, media, alta

Nella tabella 2.4 sono riportati i valori di a , b e c utilizzati per definire ogni *label* delle variabili, adottati per il caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia **negativo**.

Tabella 2.4 Parametri associati ad ogni funzione scelta per le *label*, nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia negativo.

Variabile	Valore linguistico	Tipo funzione di appartenenza	a	b	c
$T_{int} - T_{avg,ext}$	bassa	sigmoidale	27.7		-0.3538
	media	a campana	0.6133	11.9	-0.987
	alta	sigmoidale	-30		-1.617
Q_R	bassa	sigmoidale	-250		0.03933
	media	a campana	0.08629	10	0.129
	alta	a campana	0.08048	10	0.298
	molto alta	sigmoidale	250		0.3811
ΔT_{ring}	bassa	sigmoidale	15.9		-0.3486
	media	a campana	0.989	12.2	-1.342
	alta	sigmoidale	-21.8		-2.347

Rappresentando graficamente i *fuzzy sets* così definiti si può notare che le funzioni di appartenenza si intersecano tra loro, ovvero esistono dei valori numerici che possono essere descritti da più *label* contemporaneamente, con gradi di appartenenza differenti per ogni *label*. Si riportano le rappresentazioni grafiche delle funzioni di appartenenza utilizzate per ogni input e output nelle seguenti figure 2.14, 2.15, 2.16, costruite per il caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia positivo.

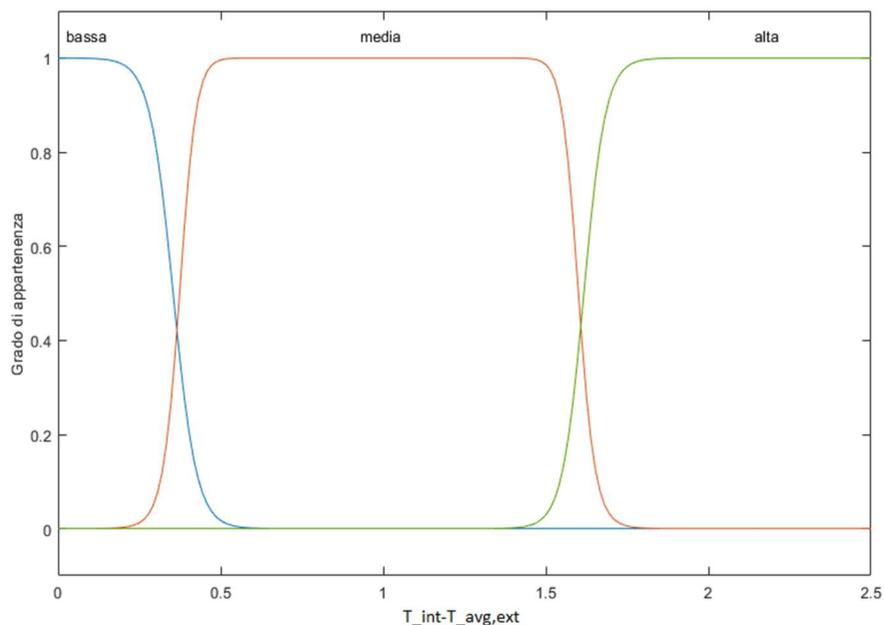


Figura 2.14 Funzioni di appartenenza relative alla variabile input $T_{int} - T_{avg,ext}$.

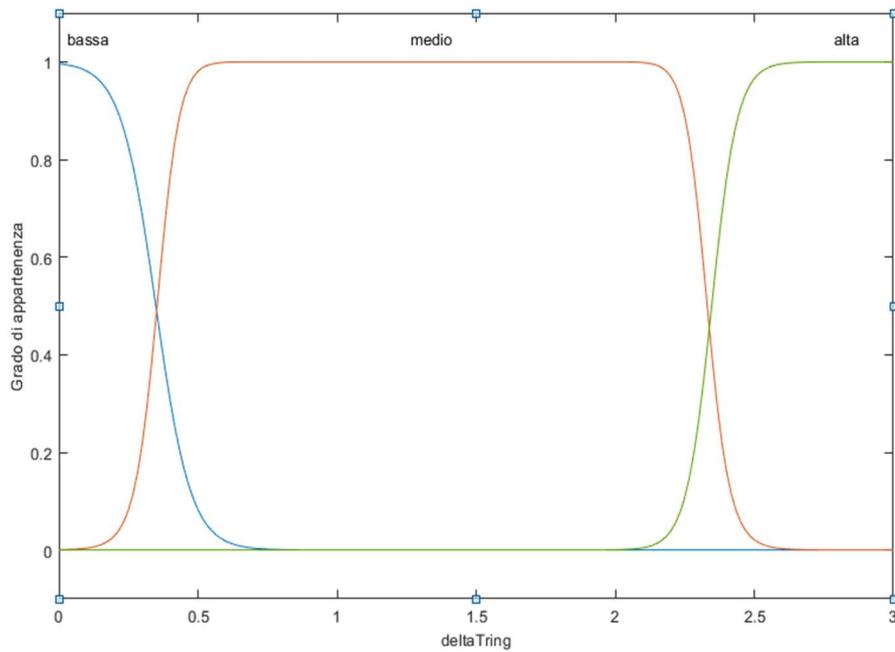


Figura 2.15 Funzioni di appartenenza relative alla variabile output ΔT_{ring} .

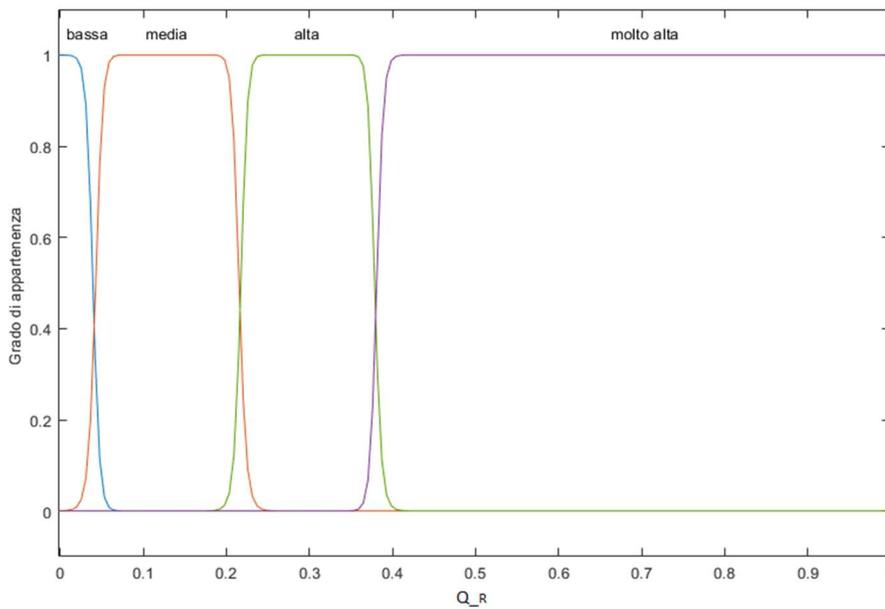


Figura 2.16 Funzioni di appartenenza relative alla variabile input Q_R .

Allo stesso modo si riportano i grafici relativi alle funzioni di appartenenza definite nel caso in cui $T_{int} - T_{avg,ext}$ sia negativo, nelle figure 2.17, 2.18; non vengono riportate nuovamente quelle relative alla variabile Q_R in quanto identiche al caso presedente mostrato in figura 2.16.

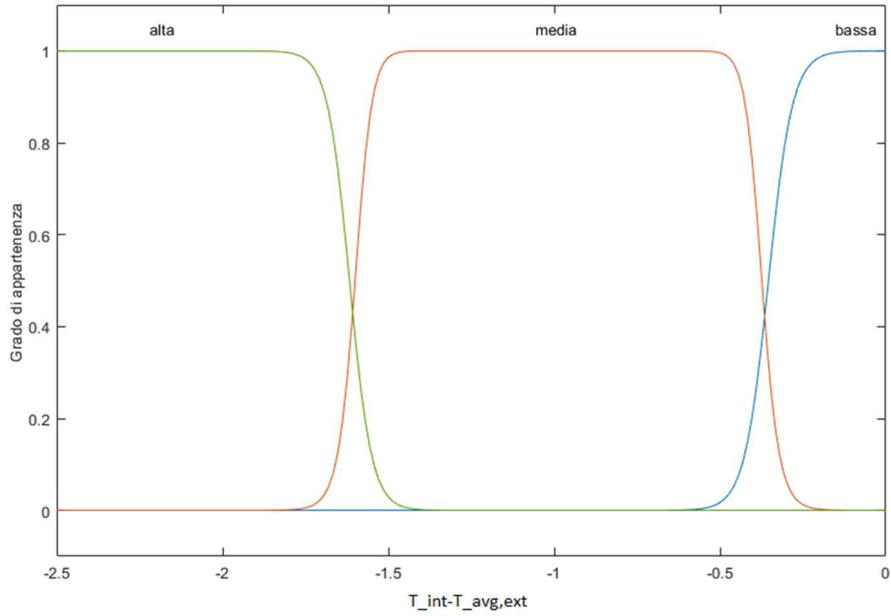


Figura 2.17 Funzioni di appartenenza relative alla variabile input $T_{int} - T_{avg,ext}$.

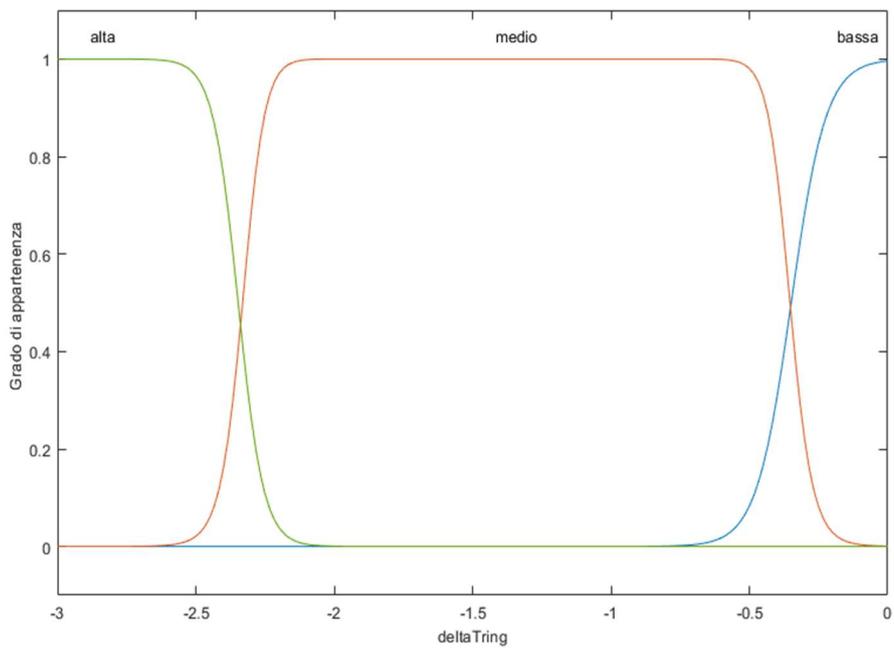


Figura 2.18 Funzioni di appartenenza relative alla variabile output ΔT_{ring} .

2.6.2 Regole *if-then*

Sono state definite 12 regole, in quanto sono presenti due variabili di input definite rispettivamente da 3 e 4 *labels*: le combinazioni possibili sono 12, e per ognuna di esse è necessario definire una regola. Il connettore logico utilizzato è AND, per cui ogni regola viene attivata solo se entrambe le condizioni definite per le variabili in input sono verificate. A tutte le regole è stato associato peso unitario, ovvero non esistono regole predominanti.

Il sistema di regole creato è il seguente:

1. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è bassa & se Q_R è bassa, allora ΔT_{ring} è bassa.
2. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è bassa & se Q_R è media, allora ΔT_{ring} è bassa.
3. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è bassa & se Q_R è alta, allora ΔT_{ring} è bassa.
4. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è bassa & se Q_R è molto alta, allora ΔT_{ring} è bassa.
5. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è media & se Q_R è bassa, allora ΔT_{ring} è media.
6. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è media & se Q_R è media, allora ΔT_{ring} è media.
7. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è media & se Q_R è alta, allora ΔT_{ring} è media.
8. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è media & se Q_R è molto alta, allora ΔT_{ring} è bassa.
9. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è alta & se Q_R è bassa, allora ΔT_{ring} è alta.
10. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è alta & se Q_R è media, allora ΔT_{ring} è alta.
11. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è alta & se Q_R è alta, allora ΔT_{ring} è media.
12. Se $T_{int}-T_{avg,ext}$ è alta & se Q_R è molto alta, allora ΔT_{ring} è media.

Nella figura 2.19 è visibile graficamente la relazione stabilita tramite le regole tra l'output e i due input.

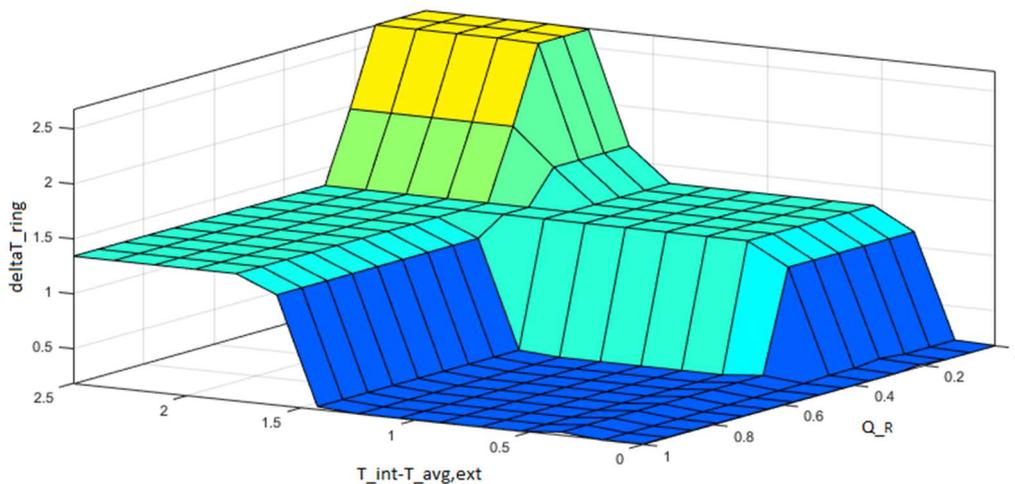


Figura 2.19 Variazione dell'output in relazione alla variazione degli input.

2.6.3 Applicazione delle regole e defuzzificazione

Per ottenere il valore numerico dell'output è stato utilizzato il metodo di inferenza Mamdani; le regole sopra definite utilizzano solo l'operatore AND, ed è stato scelto il metodo del minimo per la sua applicazione, ovvero il grado di appartenenza ad un *if*, o antecedente, di una delle regole sopracitate è pari al minor grado di appartenenza dei due input.

Se viene attivata una sola regola, il valore dell'output viene ricavato tramite implicazione, con cui si applica il metodo del minimo, sopra descritto anche per l'operatore AND.

Se vengono attivate più regole contemporaneamente, il sistema di controllo progettato procede con l'aggregazione delle regole secondo il metodo del massimo, ovvero si ottengono diverse aree sottese ai valori di troncamento delle funzioni relativi al grado di appartenenza dei valori input alle variabili linguistiche definite per ogni regola, e queste aree vengono sommate tra loro per ottenere il valore di output.

Una volta ottenuto il valore *fuzzy* dell'output si procede con la defuzzificazione tramite il metodo del centroide, presentato nel paragrafo 1.3.1.

In figura 2.20 è riportato un esempio di applicazione delle regole e defuzzificazione, ottenuto tramite il Rule Viewer del Toolbox Fuzzy Logic di Matlab:

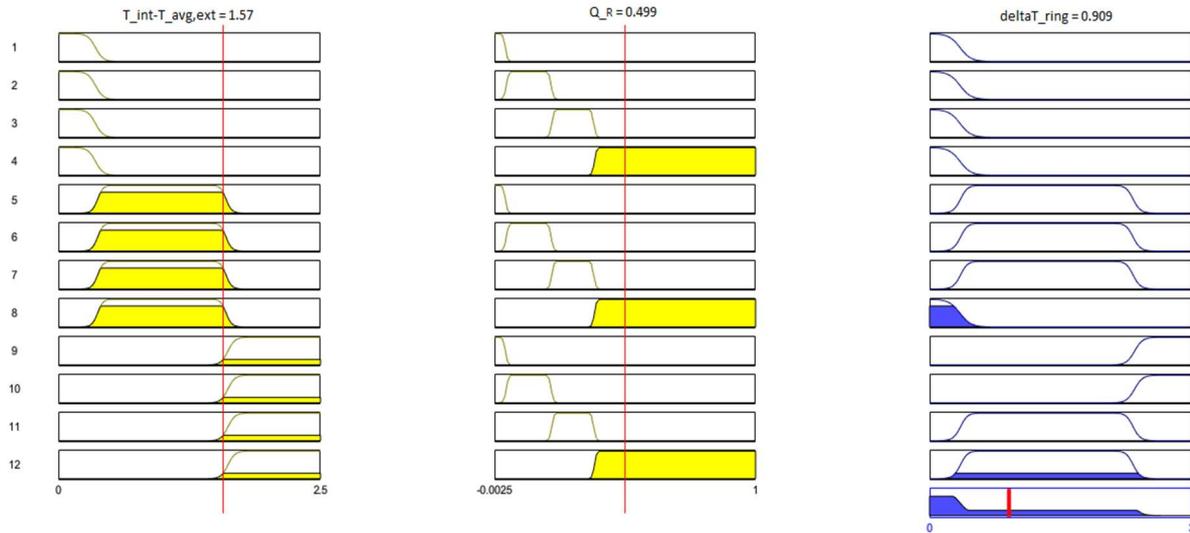


Figura 2.20 Esempio di applicazione del sistema *fuzzy* progettato, con fuzzificazione, applicazione delle regole e defuzzificazione.

Come si può vedere nella figura, la linea rossa relativa ai due valori input reali interseca diverse funzioni di appartenenza, che vengono troncate all'intersezione tra la verticale relativa al valore e la curva: si ottiene così il valore *fuzzy* degli input. Alcune regole vengono attivate, e vengono sommate le aree ottenute per ricavare l'area totale relativa all'output, rappresentata nell'ultima riga dell'output; da essa si ottiene il valore numerico reale tramite defuzzificazione con il calcolo del baricentro, rappresentato dalla linea rossa.

2.6.4 Prove sperimentali

Sono state effettuate 2 prove sperimentali nel MicroFD con lo scopo di verificare l'effettivo funzionamento del sistema di controllo progettato, in diverse condizioni di temperatura del ripiano e pressione della camera:

1. $T_{shelf}=0^{\circ}\text{C}$, $P_c=90\text{mTorr}$;
2. $T_{shelf}= -20^{\circ}\text{C}$, $P_c=60\text{mTorr}$.

In entrambe le prove le misure considerate sono i profili di temperatura relativi al prodotto nel flacone interno e quelli medi rilevati nei flaconi esterni, nonché il profilo di temperatura dell'anello *LyoSim*.

2.6.5 Preparazione dei campioni

La sequenza di operazioni svolta durante ogni prova è la seguente:

- Preparazione della soluzione acquosa di saccarosio al 5% in peso, mediante l'ausilio dell'agitatore *Medline MS200*;

- Riempimento dei flaconi con 5 ml di soluzione mediante pipetta *Eppendorf Multipette® plus*;
- Pesatura dei flaconi mediante bilancia digitale *Mettler Toledo, modello MS204S/0*: la pesatura in questo caso viene fatta per verificare che tra i flaconi ci sia una bassa deviazione standard iniziale;
- Posizionamento degli *stopper* e delle termocoppie, facendo in modo che il punto di contatto tra l'estremità della termocoppia (parte responsabile della misura) e il fondo del flacone sia centrale;
- Posizionamento dei flaconi nella camera e chiusura della camera stessa;
- Avvio della prova;
- Raccolta dei dati: dopo la fase di congelamento, all'inizio della fase dell'essiccamento primario si inizia il controllo della temperatura dell'anello *LyoSim*, prelevando i dati necessari al calcolo dell'*offset* (temperatura rilevata nel flacone interno, temperatura rilevata nei 3 flaconi monitorati esterni, temperatura dell'anello *LyoSim*), e impostando l'*offset* calcolato per 10 minuti. Il controllo viene effettuato sino al raggiungimento dello stazionario, in quanto dopo non si hanno più effetti significativi nelle variabili controllate;
- Alla fine della prova, prelievo dei flaconi dalla camera.

3. Risultati e discussione

In questo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti nelle prove effettuate nel MicroFD e nel liofilizzatore REVO. La prima parte del lavoro è incentrata sullo studio del confronto tra *micro* e *macro* scala: le analisi effettuate finora sul MicroFD avevano l'obiettivo di ottenere al suo interno un batch omogeneo, mantenendo prossima allo zero la differenza di temperatura tra il prodotto nei flaconi centrali e quello nei flaconi esterni, in modo da riprodurre in esso la durata del processo condotto poi in un liofilizzatore industriale. Per questo motivo ci si è focalizzati soprattutto sul comportamento dei flaconi centrali, i quali sono determinanti per stabilire la durata del processo, utilizzando temperature del *LyoSim* relative ad *offset* negativi, con l'obiettivo cioè di raffreddare i flaconi esterni (soggetti all'irraggiamento), ed avere in tutti l'evoluzione propria dei flaconi interni di un batch processato in un'apparecchiatura di scala maggiore. Nel presente lavoro di Tesi si è indagato l'utilizzo del MicroFD sia per la simulazione dei flaconi centrali di batch di differenti dimensioni, ma soprattutto per la simulazione dei flaconi laterali: essi non sono determinanti per la durata del processo, in quanto sono i primi in cui termina l'essiccamento, ma sono soggetti all'effetto di bordo, che comporta temperature mediamente più alte e che possono causare micro-collassi o collassi indesiderati.

Sia gli studi precedenti effettuati sui flaconi centrali che quelli mostrati nella prima parte del presente lavoro di Tesi sono stati eseguiti variando la temperatura dell'anello che circonda i flaconi nel MicroFD, e ripetendo lo studio per diverse combinazioni di temperatura del ripiano e pressione della camera, così da vedere per quale temperatura dell'anello si ottenevano le condizioni desiderate. Nel caso in cui si vogliano riprodurre nel MicroFD le condizioni di essiccamento dei flaconi di bordo di una apparecchiatura industriale questa è l'unica procedura attuabile, in quanto non sono note, a priori, le condizioni in cui i flaconi di bordo vengono a trovarsi in un'apparecchiatura di scala maggiore. Se l'obiettivo è invece riprodurre la dinamica dei flaconi centrali di un liofilizzatore industriale, si può operare senza procedere per tentativi, ma impiegando un sistema di controllo che regoli in automatico la temperatura dell'anello esterno, in modo da minimizzare la differenza di temperatura in flaconi esterni ed interni, così da diminuire i tempi relativi alla sperimentazione; lo sviluppo e la convalida di questo sistema, mediante logica *fuzzy*, è stato l'obiettivo della seconda parte del lavoro.

3.1 Flaconi 6R

In questo paragrafo vengono riportati i risultati di test effettuati nel liofilizzatore REVO su due batch di dimensioni differenti, che consentono di avere contezza delle dinamiche che si vogliono riprodurre nel MicroFD, e vengono comparati ai test effettuati nel MicroFD sia con *offset* negativi (realizzati in un precedente lavoro di Tesi) sia con *offset* positivi; tutti i test sono stati realizzati con una temperatura del ripiano pari a -20°C e una pressione della camera pari a 60 mTorr.

3.1.1 Parametro K_v

Come già detto precedentemente, l'obiettivo nella prima parte di questo lavoro di Tesi è stato la riproduzione della dinamica del processo effettuato nel liofilizzatore REVO utilizzando il MicroFD: per questo motivo sono stati ricavati i valori del coefficiente di scambio di calore K_v relativi ai singoli flaconi, i quali sono stati mappati mediante l'utilizzo del software Matlab sotto forma di *Colormaps*; questa modalità di rappresentazione offre una visualizzazione immediata della situazione in cui si trova ogni batch studiato.

I valori di K_v dei singoli flaconi sono stati calcolati in modo diverso, in base alle misure di temperatura disponibili nel MicroFD o nel liofilizzatore REVO in ciascuna prova. I profili ottenuti nel MicroFD sono stati calcolati mediante l'utilizzo, nell'equazione 2.4, dell'integrale della differenza di temperatura tra il ripiano e quella del prodotto **media totale**, in quanto la differenza rispetto all'utilizzo della temperatura media rilevata dalle termocoppie poste nei flaconi esterni e all'utilizzo di quella media rilevata dalle termocoppie poste nei flaconi interni (rispettivamente per il calcolo del parametro relativo ai flaconi esterni e centrali) risulta praticamente nulla, con una differenza nei parametri K_v calcolati tramite i due diversi integrali minore di $0.5 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$; ciò è visibile anche in figura 3.1. Per il calcolo relativo ai batch effettuati nel liofilizzatore REVO è stata invece utilizzata la temperatura media dei flaconi **lateral**i per il calcolo del parametro K_v nei flaconi laterali, e quella media dei flaconi **central**i per calcolare quello dei centrali: questa distinzione permette di ottenere un risultato più accurato essendo abbastanza differenti rispetto all'integrale ottenuto mediante l'utilizzo della media totale.

Nella figura 3.1 vengono riportati i profili di temperatura ottenuti con le termocoppie poste nei flaconi esterni e interni nel MicroFD, relativi alle prove finalizzate alla simulazione dei flaconi laterali, e comparati con quelli rilevati nei flaconi esterni del liofilizzatore REVO.

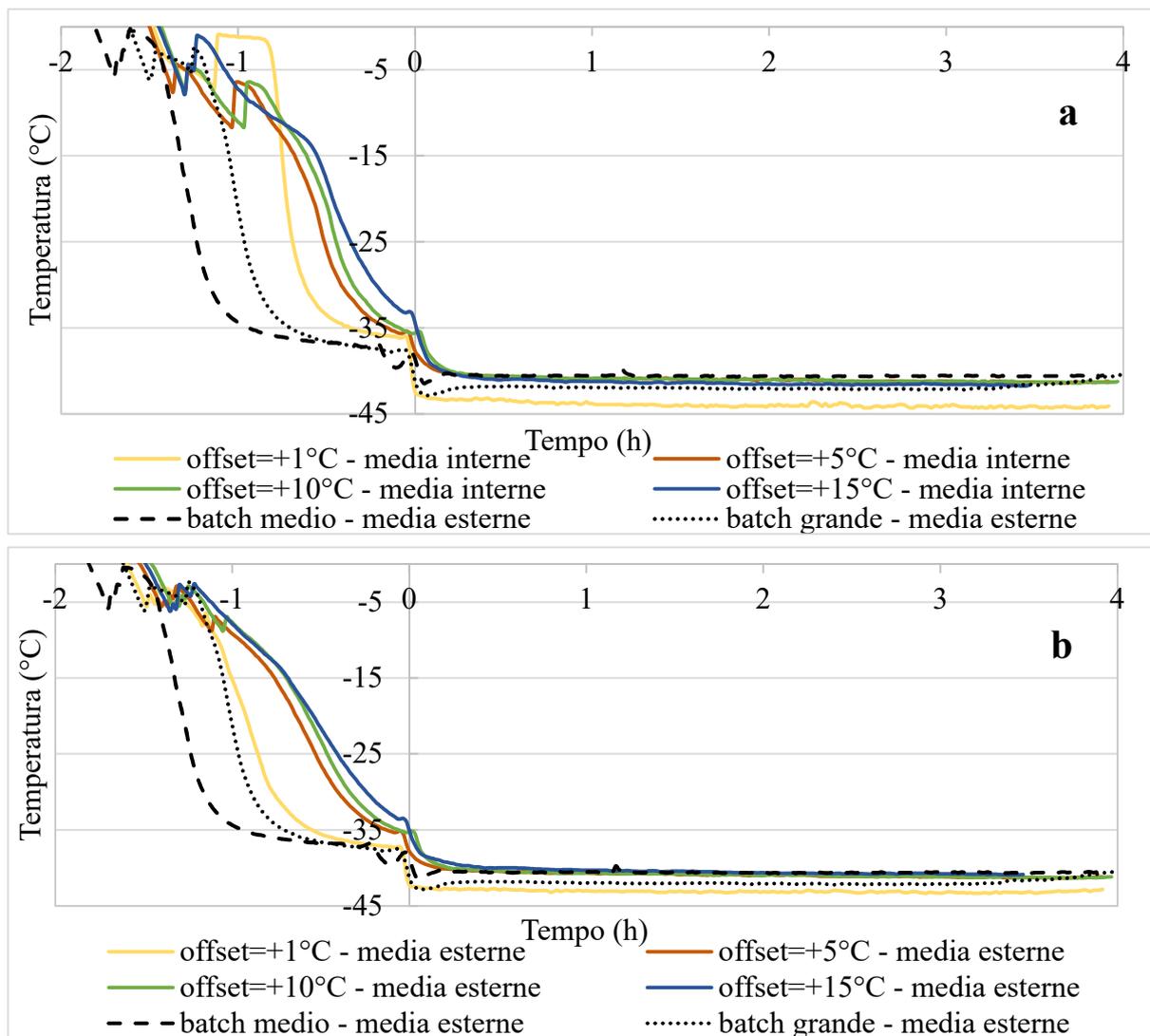


Figura 3.1 Confronto tra i profili di temperatura: a) profili di temperatura media dei flaconi interni rilevati nel MicroFD e profili di temperatura media dei flaconi esterni rilevati nel liofilizzatore REVO; b) profili di temperatura media dei flaconi esterni rilevati nel MicroFD e i profili di temperatura media dei flaconi esterni rilevati nel liofilizzatore REVO.

Osservando la figura si nota che durante l'essiccamento primario non c'è differenza nel valutare i profili dati dalle termocoppie poste nei flaconi centrali o laterali del MicroFD (la massima differenza rilevata è nell'ordine di un solo grado centigrado e può essere attribuita all'incertezza delle termocoppie) per fare il confronto con i profili di temperatura rilevati nei flaconi esterni del liofilizzatore REVO, per cui si può utilizzare la media totale della temperatura rilevata nel MicroFD.

Nelle figure 3.2 e 3.3 vengono riportati i valori del parametro K_v ottenuti per i singoli flaconi.

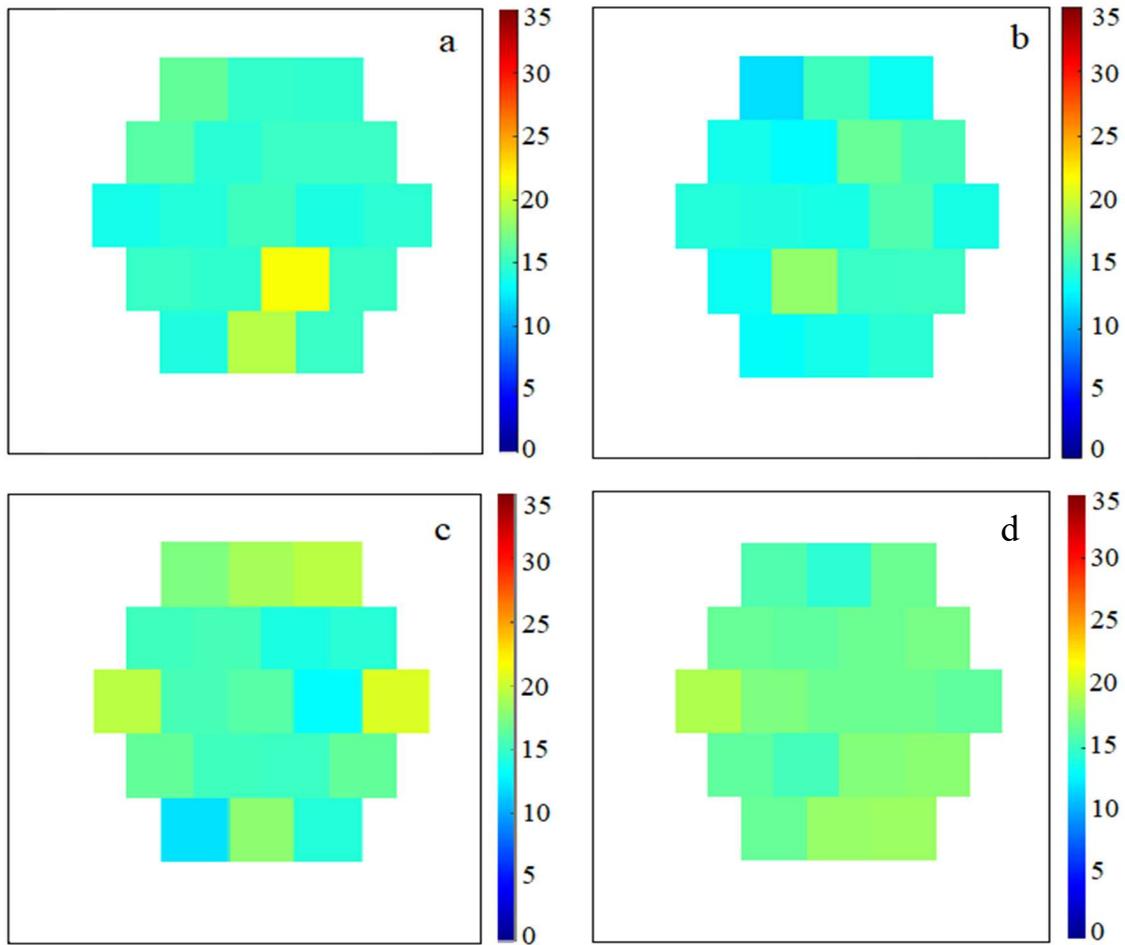


Figura 3.2 Colormaps raffiguranti i valori di K_v rilevati nel MicroFD per i seguenti casi: a) $offset = -7^\circ\text{C}$; b) $offset = -5^\circ\text{C}$; c) $offset = -3^\circ\text{C}$; d) $offset = -1^\circ\text{C}$.

Come si nota dall'osservazione della figura 3.2 il batch ottenuto tramite l'impostazione di $offset$ negativi per l'anello *LyoSim* è omogeneo, in quanto i valori di K_v dei flaconi interni e di quelli esterni sono molto simili tra loro.

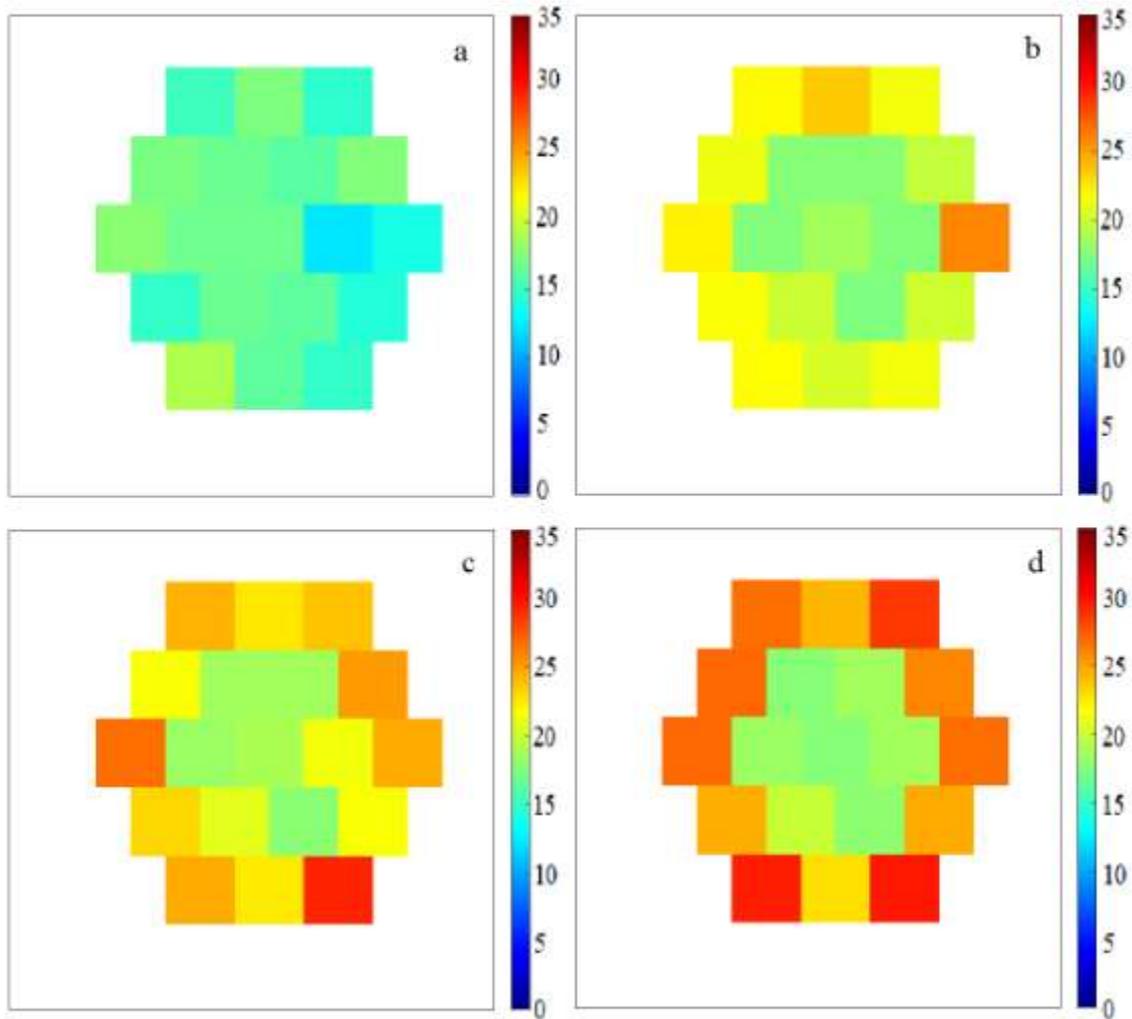


Figura 3.3 Colormaps raffiguranti i valori di K_v rilevati nel MicroFD per i seguenti casi: a) $offset=+1^\circ\text{C}$; b) $offset=+5^\circ\text{C}$; c) $offset=+10^\circ\text{C}$; d) $offset=+15^\circ\text{C}$.

Analizzando la figura 3.3 si nota la presenza di una maggiore disomogeneità con l'utilizzo di *offset* positivi, che aumenta all'aumentare della temperatura utilizzata. La presenza di 7 flaconi centrali, non a contatto con il *LyoSim*, determina un valore minore del parametro K_v di questi flaconi e di conseguenza anche un valore minore di quello medio totale, per cui sono necessari elevati *offset* per ottenere il valore del coefficiente di scambio termico ottenuto nei flaconi laterali dei due batch realizzati nel REVO. In figura 3.4 sono infatti riportati i valori di K_v ottenuti per un batch con carico parziale del ripiano, definito **medio** e contenente 105 flaconi, e quelli ottenuti per un batch con carico totale del ripiano, definito **grande** e contenente 210 flaconi. In entrambi i casi i flaconi sono stati disposti in uno schema esagonale, in 14 file alternate con 7/8 flaconi ciascuna nel batch medio e 14 file alternate con 15 flaconi ciascuna nel batch grande.

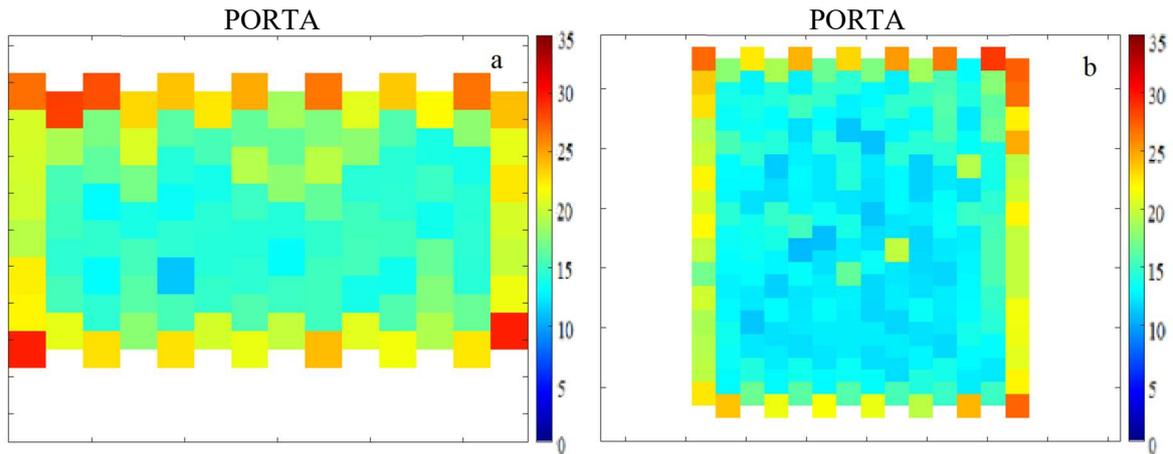


Figura 3.4 Colormaps raffiguranti i valori di K_v rilevati nel liofilizzatore REVO per i seguenti casi: a) batch REVO medio, 105 flaconi; b) batch REVO grande, 210 flaconi.

Dall'osservazione dei valori del parametro K_v dei singoli flaconi ottenuti per i due batch, risulta evidente l'aumento dell'effetto di bordo nel batch con carico parziale rispetto a quello con carico totale: questa differenza è dovuta al diverso rapporto tra il numero dei flaconi interni e quelli esterni, che è maggiore nel caso con carico completo; ciò implica, nel batch medio, una maggiore esposizione all'effetto di bordo anche di file più interne, come la seconda fila. Dal minore rapporto tra numero di flaconi centrali ed esterni consegue anche una differenza nei valori del parametro K_v medio dei flaconi centrali, che risulta più alto nel caso del batch medio rispetto a quello del grande; ciò è osservabile in figura 3.5.

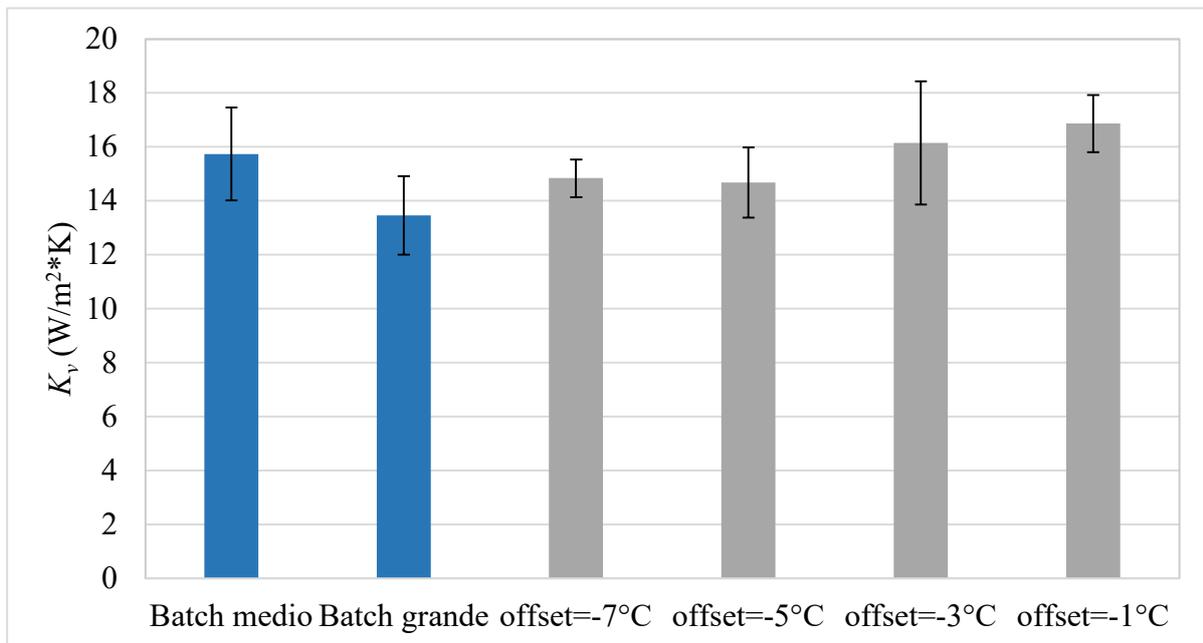


Figura 3.5 Confronto tra i valori del parametro K_v medio dei flaconi centrali dei due batch del liofilizzatore REVO e medio totale dei batch effettuati nel MicroFD.

I flaconi esterni del batch con carico parziale e quelli del batch con carico completo non mostrano invece sostanziali differenze nei valori del parametro K_v , in quanto si trovano nelle stesse condizioni: per questo motivo, il valore medio ottenuto per i flaconi esterni risulta lo stesso, come si può osservare nella figura 3.6.

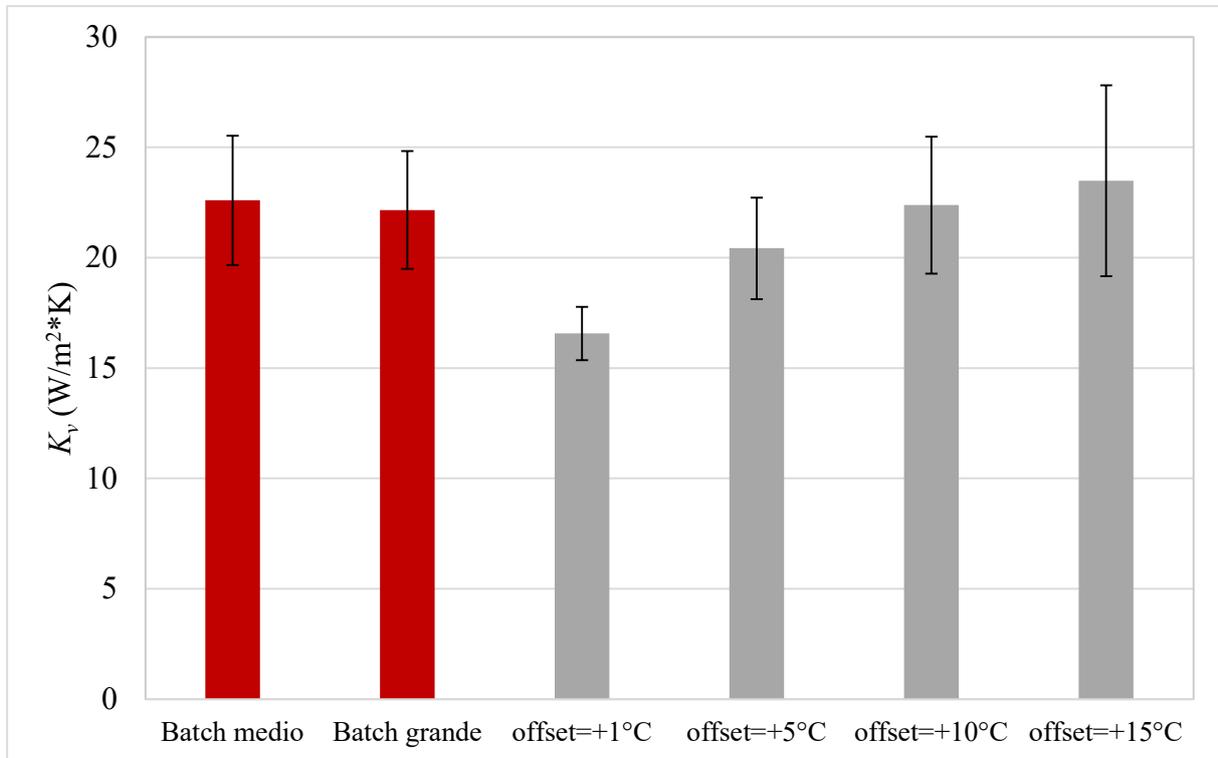


Figura 3.6 Confronto tra i valori del parametro K_v medio dei flaconi laterali dei due batch del liofilizzatore REVO e medio totale dei batch effettuati nel MicroFD.

Le barre di errore rappresentate nelle figure 3.5 e 3.6 presentano la deviazione standard, calcolata relativamente ai flaconi centrali dei batch REVO e a tutti i flaconi dei batch processati nel MicroFD in figura 3.5, e relativamente ai flaconi laterali dei batch processati nel REVO e a tutti i flaconi dei batch processati nel MicroFD in figura 3.6.

Dall'analisi delle *Colormaps* e delle barre di variabilità dei valori del parametro K_v riportati nelle figure precedenti, si evince che:

- I flaconi centrali possono essere simulati con diversi *offset* nel MicroFD, in funzione del numero di flaconi costituenti il batch analizzato: se il carico è parziale l'*offset* ottimale risulta essere pari a -3°C , mentre se il carico è totale è pari a -5°C . Tuttavia, l'elevata deviazione standard caratterizzante i risultati ottenuti nel liofilizzatore REVO, unitamente alla deviazione standard presente nel batch del MicroFD, permette una scelta abbastanza flessibile dell'*offset* da utilizzare in entrambi i casi;
- I flaconi laterali dei due batch condotti nel liofilizzatore di scala pilota si trovano nelle stesse condizioni, per cui in entrambi i casi possono essere simulati nel MicroFD con un *offset* pari a $+10^{\circ}\text{C}$: i risultati ottenuti con questa condizione infatti presentano una deviazione standard minore rispetto a quella rilevata con un *offset* pari a $+15^{\circ}\text{C}$, il che

implica una migliore omogeneità del batch. Anche la condizione con *offset* pari a +5°C potrebbe essere presa in considerazione; tuttavia le *Colormaps* evidenziano, nel caso di *offset* pari a +10°C, la presenza di più flaconi nelle stesse condizioni di quelli posti dal lato della porta del liofilizzatore REVO, che hanno una temperatura mediamente più alta rispetto a quelli posti sul fondo e lateralmente; questa differenza è dovuta al fatto che la porta non è in materiale metallico: si è cercato di minimizzare l'effetto di bordo causato dall'irraggiamento mediante l'utilizzo di un foglio di alluminio posto nella parte interna della porta, ma il suo effetto risulta comunque visibile nel valore del parametro K_v dei flaconi più vicini ad essa, ovvero quelli della prima fila.

3.1.2 Parametro R_p

Il parametro R_p è stato misurato effettuando un ulteriore test con temperatura del ripiano pari a -20°C e pressione della camera pari a 60 mTorr, sia nei due batch di differenti dimensioni nel liofilizzatore REVO sia nel MicroFD, adottando un *offset* pari a -5°C per la simulazione dei flaconi centrali e un *offset* pari a +10°C per la simulazione di quelli laterali; è stata utilizzata una soluzione acquosa al 5% in peso di saccarosio.

Di seguito vengono riportati, nelle figure 3.7 e 3.8, i profili di temperatura ottenuti durante le prove: la loro comparazione permette di capire se i flaconi hanno avuto la stessa storia termica.

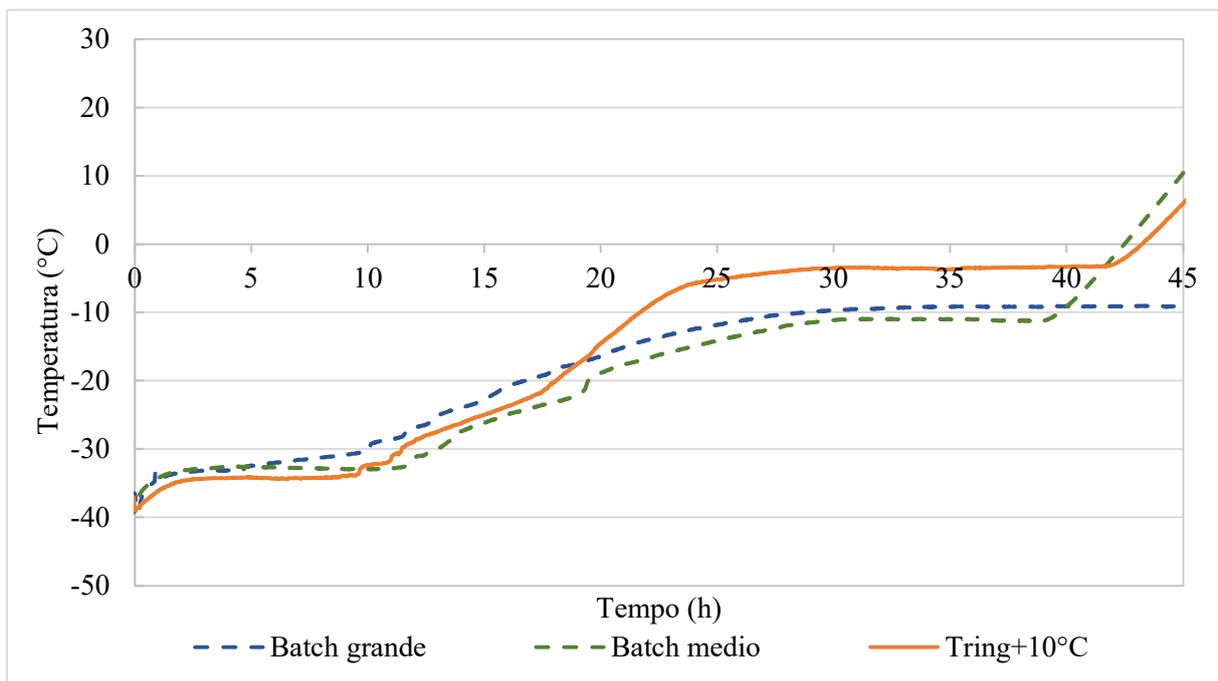


Figura 3.7 Confronto tra i profili di temperatura media dei flaconi esterni monitorati nei due batch condotti nel liofilizzatore REVO e media totale dei flaconi monitorati nel MicroFD.

Il profilo di temperatura ottenuto per i flaconi laterali risulta molto simile per tutti e tre i casi: ciò implica l'ottenimento di un valore del parametro R_p simile tra i flaconi studiati nel MicroFD e quelli nel liofilizzatore REVO.

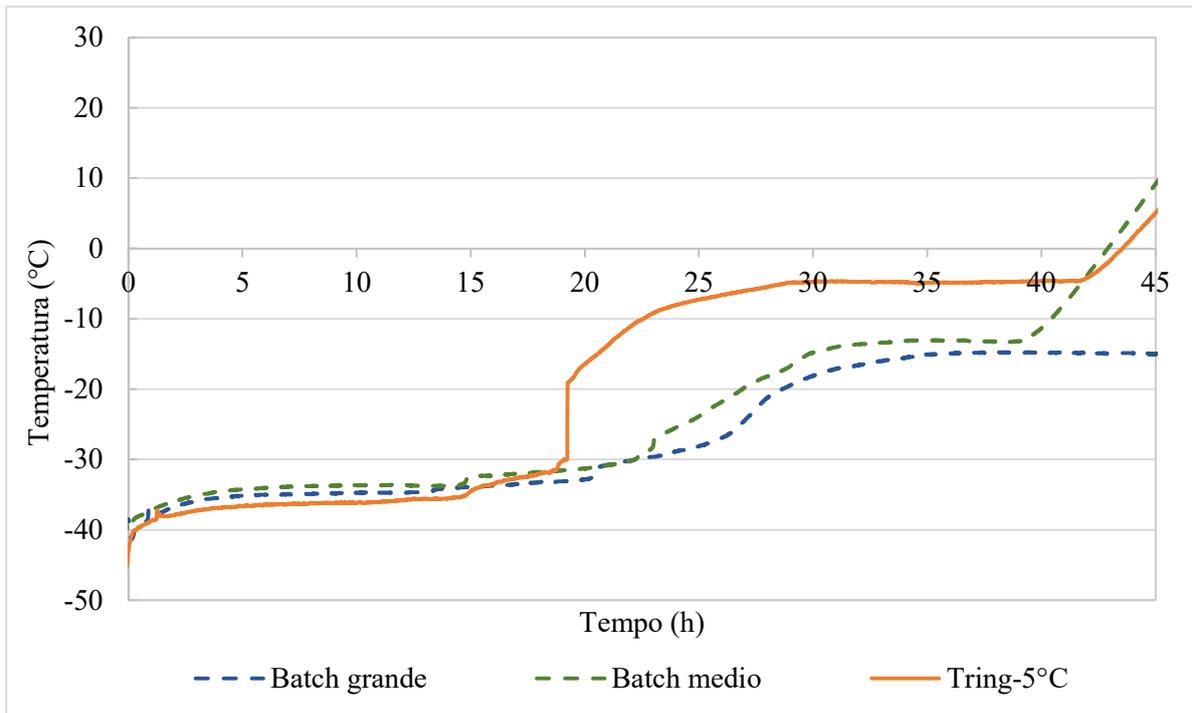


Figura 3.8 Confronto tra i profili di temperatura media dei flaconi interni monitorati nei due batch condotti nel liofilizzatore REVO e media totale dei flaconi monitorati nel MicroFD.

Anche nel caso dei flaconi centrali i profili di temperatura coincidono nella fase stazionaria dell'essiccamento primario; si procede quindi con il calcolo del valore della resistenza al flusso di sublimazione, riportato nelle figure 3.9 e 3.10 in funzione dello spessore dello strato secco.

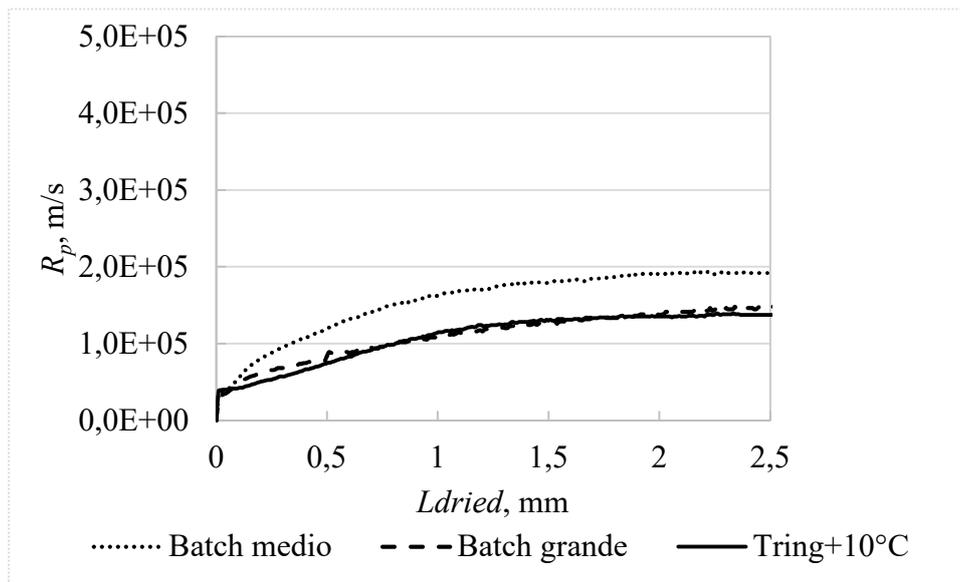


Figura 3.9 Confronto dei valori del parametro R_p ottenuto nei batch effettuati nel REVO e nel batch effettuato nel MicroFD per la simulazione dei flaconi laterali.

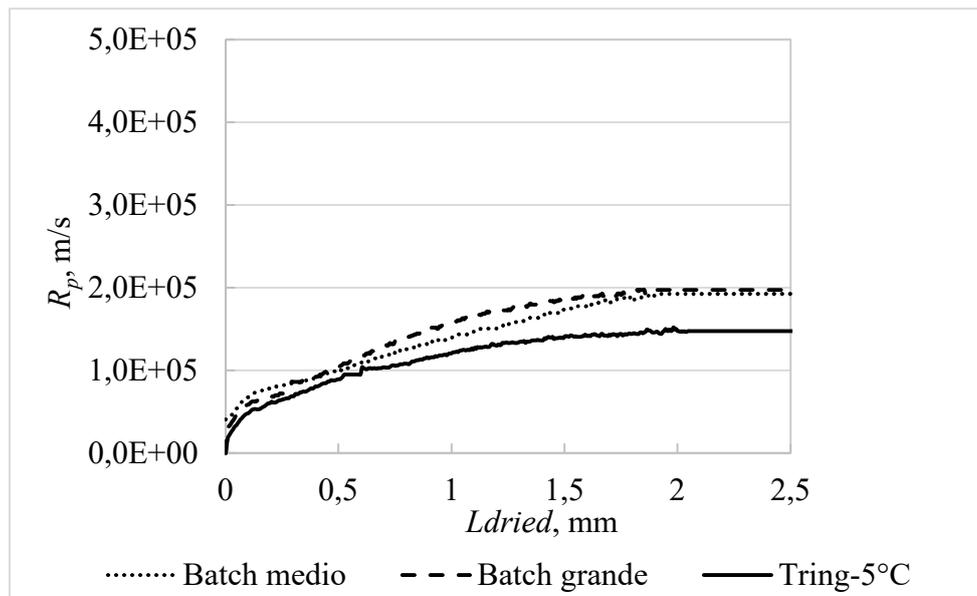


Figura 3.10 Confronto dei valori del parametro R_p ottenuto nei batch effettuati nel REVO e nel batch effettuato nel MicroFD per la simulazione dei flaconi centrali.

Osservando i profili ottenuti si nota che i valori del parametro R_p sono dello stesso ordine di grandezza, anche se i profili non sono perfettamente sovrapposti in tutti i casi: considerando però l'incertezza usualmente associata a tale parametro, i valori ottenuti possono essere considerati accettabili. Essi sono stati ottenuti considerando il parametro K_v medio totale e la temperatura media totale nel MicroFD, mentre per i due batch processati nel REVO sono stati considerati il parametro K_v medio dei flaconi esterni e la temperatura media dei flaconi esterni mostrati in figura 3.9, e il parametro K_v medio dei flaconi interni e la temperatura media dei flaconi interni mostrati in figura 3.10.

La non completa sovrapposizione dei due profili può essere dovuta alla natura del soluto utilizzato, il saccarosio: esso tende a formare, nello strato secco, pori di differenti dimensioni, a causa della presenza di micro-collapsi o del distaccamento della struttura porosa dalle pareti del flacone, con conseguente variazione del valore della resistenza R_p al variare della temperatura, come è stato rilevato anche da Goldman et al., 2019.

3.2 Flaconi 20R

In questo paragrafo vengono riportati i risultati ottenuti nei test effettuati nel MicroFD sia con *offset* negativi (realizzati in un precedente lavoro di Tesi) sia con *offset* positivi per simulare l'evoluzione di flaconi liofilizzati nel REVO, considerando un batch di 84 flaconi (i test in questione sono stati condotti in un precedente lavoro di Tesi). Lo studio è stato effettuato con una temperatura del ripiano pari a -20°C e una pressione della camera pari a 60 mTorr per valutare il coefficiente di scambio termico K_v , mentre i test per confrontare i valori del parametro R_p sono stati effettuati a 0°C e 60 mTorr, utilizzando soluzioni acquose di saccarosio al 5% e al 10% .

3.2.1 Parametro K_v

Lo studio del processo condotto con i flaconi 20R è stato condotto seguendo la stessa metodologia utilizzata per i flaconi 6R, ovvero partendo dall'analisi puntuale del parametro K_v . Nelle figure 3.11 e 3.12 vengono riportate le *Colormaps* ottenute mediante l'utilizzo del software Matlab, in cui il calcolo è stato effettuato nello stesso modo del caso con i flaconi 6R.

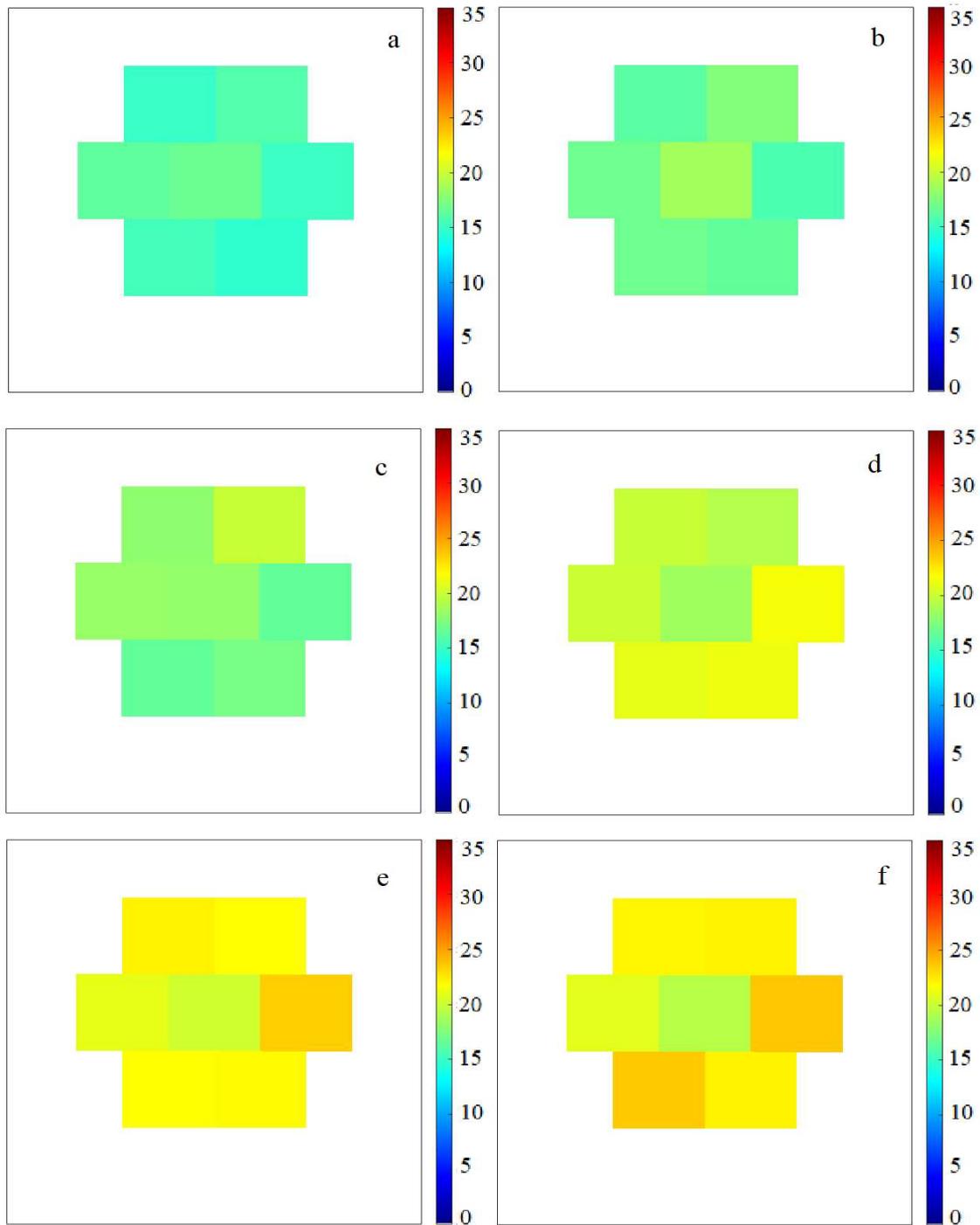


Figura 3.11 *Colormaps* raffiguranti i valori di K_v rilevati nel MicroFD per i seguenti casi: a) *offset*=-5°C; b) *offset*=-3°C; c) *offset*=-1°C; d) *offset*=+3°C; e) *offset*=+5°C; f) *offset*=+7°C.

Dall'osservazione dei valori del parametro K_v ottenuti nel MicroFD per i singoli flaconi si nota la maggiore omogeneità del batch costituito dai flaconi 20R rispetto a quello costituito dai 6R: ciò è dovuto alla presenza della maggioranza di flaconi esterni, con un solo flacone in posizione centrale. Inoltre, gli *offset* positivi utilizzati sono stati minori rispetto a quelli necessari in presenza del flacone 6R: in questo caso infatti è presente un solo flacone centrale che non è a contatto con il *LyoSim*, ed esso ha un peso esiguo ai fini della valutazione del K_v medio.

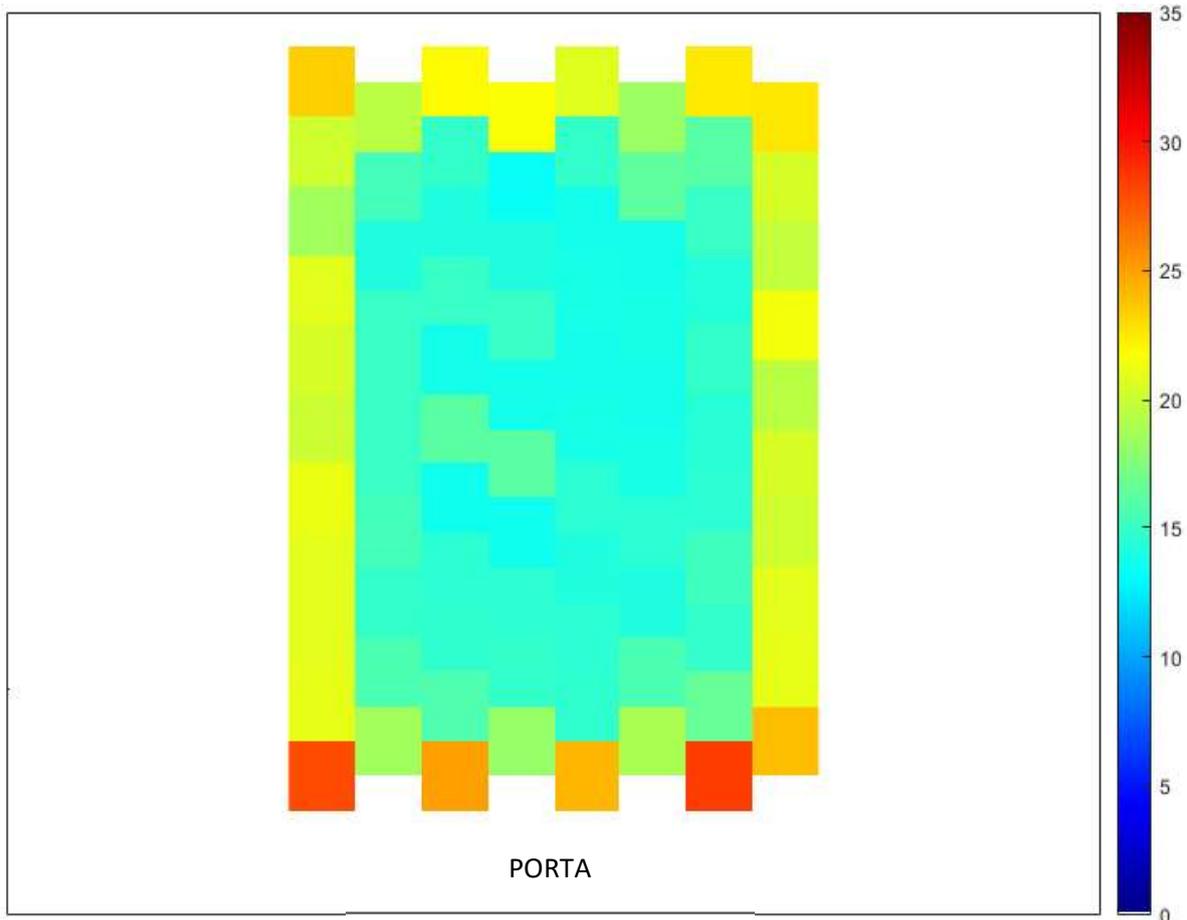


Figura 3.12 Colormap raffigurante i valori di K_v nel batch condotto nel liofilizzatore REVO di 84 flaconi.

Il batch realizzato nel liofilizzatore REVO con 84 flaconi corrisponde ad una condizione con carico totale del ripiano: si osserva un comportamento molto simile al batch “grande” effettuato con i flaconi 6R, con una preponderanza del numero di flaconi centrali rispetto a quelli laterali che determina la limitazione dell'effetto di bordo soltanto ai flaconi della prima fila; inoltre, anche in questo caso è evidente l'effetto dell'irraggiamento della porta.

Nelle figure 3.13 e 3.14 vengono riportati i valori medi ottenuti per il parametro K_v .

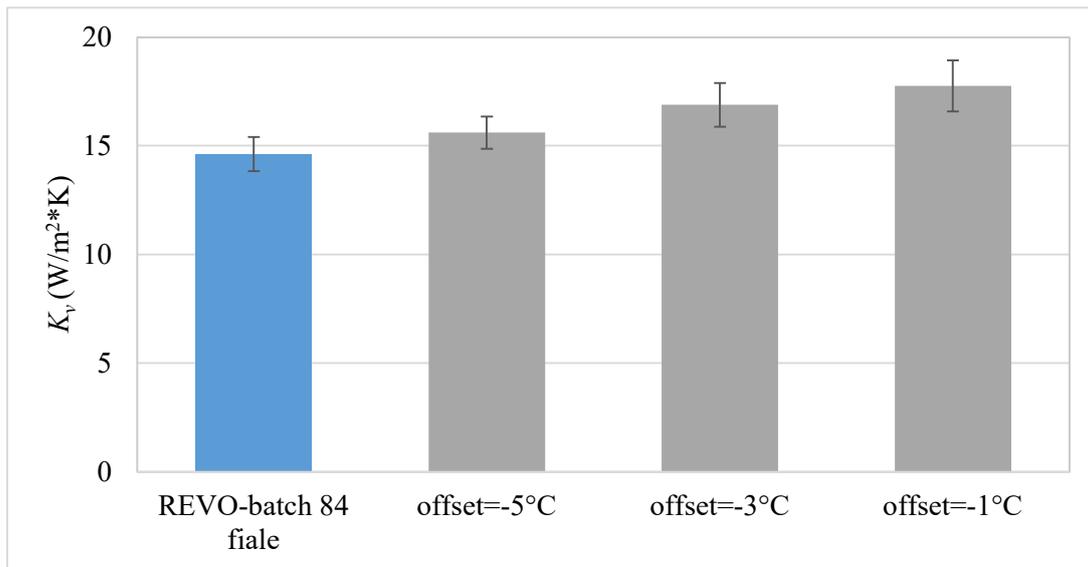


Figura 3.13 Confronto tra i valori del parametro K_v medio dei flaconi centrali del batch condotto nel liofilizzatore REVO e medio totale dei batch effettuati nel MicroFD.

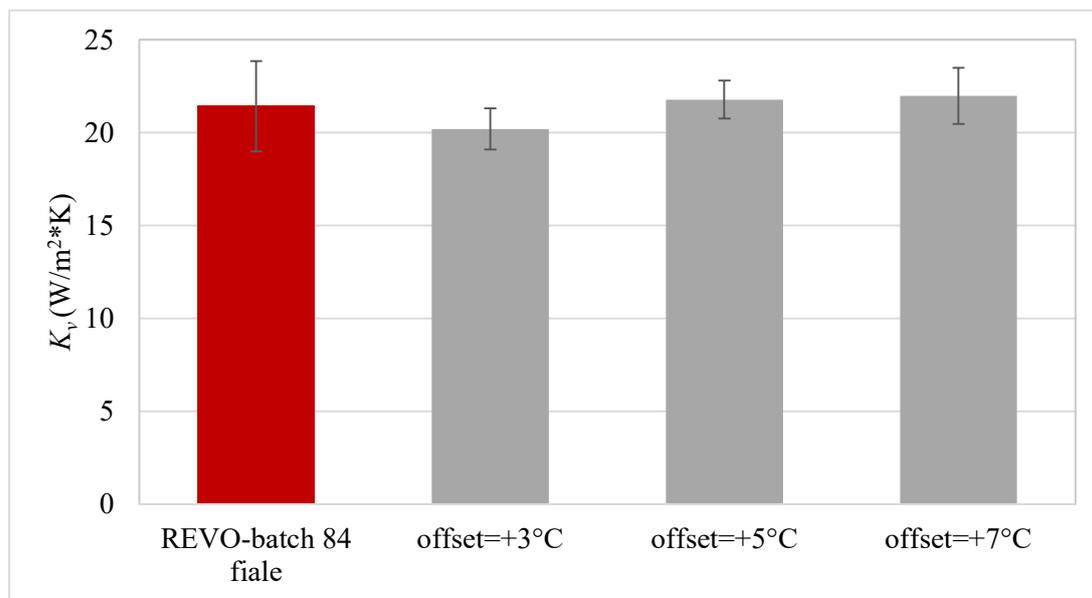


Figura 3.14 Confronto tra i valori del parametro K_v medio dei flaconi laterali del batch condotto nel liofilizzatore REVO e medio totale dei batch effettuati nel MicroFD.

Le barre di errore rappresentate nelle figure 3.13 e 3.14 presentano la deviazione standard, calcolata relativamente ai flaconi centrali dei batch condotti nel REVO e a tutti i flaconi dei batch condotti nel MicroFD in figura 3.13, e relativamente ai flaconi laterali dei batch condotti nel REVO e a tutti i flaconi dei batch condotti nel MicroFD in figura 3.14.

Dall'analisi delle *Colormaps* e delle barre dei valori medi del parametro K_v riportati nelle figure precedenti, si deduce che:

- Per i flaconi centrali, l'unico *offset* adatto è quello pari a -5°C, essendo quello con il valore medio del parametro K_v più simile a quello ottenuto nel liofilizzatore REVO: la

sceita è più limitata rispetto al caso dei flaconi 6R, data la minore deviazione standard ottenuta per i flaconi 20R;

- Per i flaconi laterali non si nota una grande differenza tra i valori ottenuti con i vari *offset*, ma quello pari a +5°C è stato ritenuto il più adatto: presenta dei valori più alti del parametro K_v per i singoli flaconi rispetto a quelli ottenuti con *offset* pari a +3°C, ed è quindi in grado di descrivere meglio la condizione in cui si trovano i flaconi più vicini alla porta e quelli posti al fondo, che sono mediamente più caldi rispetto agli altri laterali; inoltre, il test effettuato con *offset* pari a +5°C presenta una deviazione standard leggermente inferiore rispetto al caso +7°C.

3.2.2 Parametro R_p

Il parametro R_p è stato calcolato effettuando un ulteriore test con temperatura del ripiano pari a 0°C e pressione della camera pari a 60 mTorr, sia col batch di 84 flaconi nel liofilizzatore REVO sia nel MicroFD, adottando un *offset* pari a -5°C per la simulazione dei flaconi centrali e un *offset* pari a +5°C per la simulazione di quelli laterali; è stata utilizzata una soluzione acquosa al 10% in peso di saccarosio per verificare la simulazione nel MicroFD dei flaconi centrali e al 5% per verificare la simulazione nel MicroFD dei flaconi laterali. I risultati relativi ai flaconi centrali vengono riportati per completare l'analisi relativa all'utilizzo del MicroFD per la simulazione di un batch condotto nel liofilizzatore REVO, in quanto i test ad essi relativi sono stati realizzati in precedenti lavori di Tesi.

In figura 3.15 si riportano i profili del parametro R_p ottenuti per i flaconi centrali del liofilizzatore REVO e per la media totale del MicroFD: i due profili sono sostanzialmente sovrapposti.

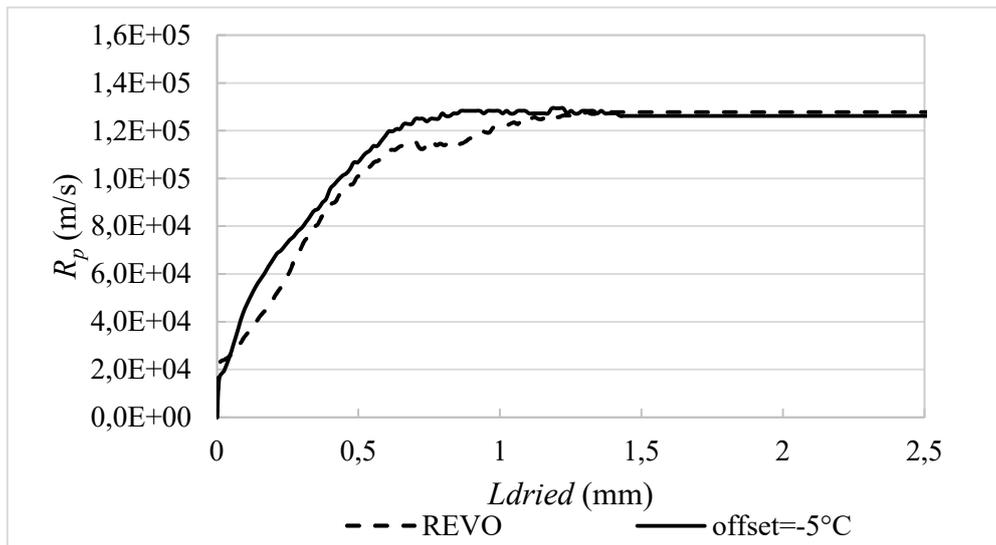


Figura 3.15 Confronto dei valori del parametro R_p ottenuto nel batch effettuato nel REVO e nel batch effettuato nel MicroFD per la simulazione dei flaconi centrali.

In figura 3.16 si riportano i profili di R_p relativi ai flaconi laterali del liofilizzatore REVO e quelli ottenuti nel MicroFD in condizioni che cercavano di riprodurre la dinamica.

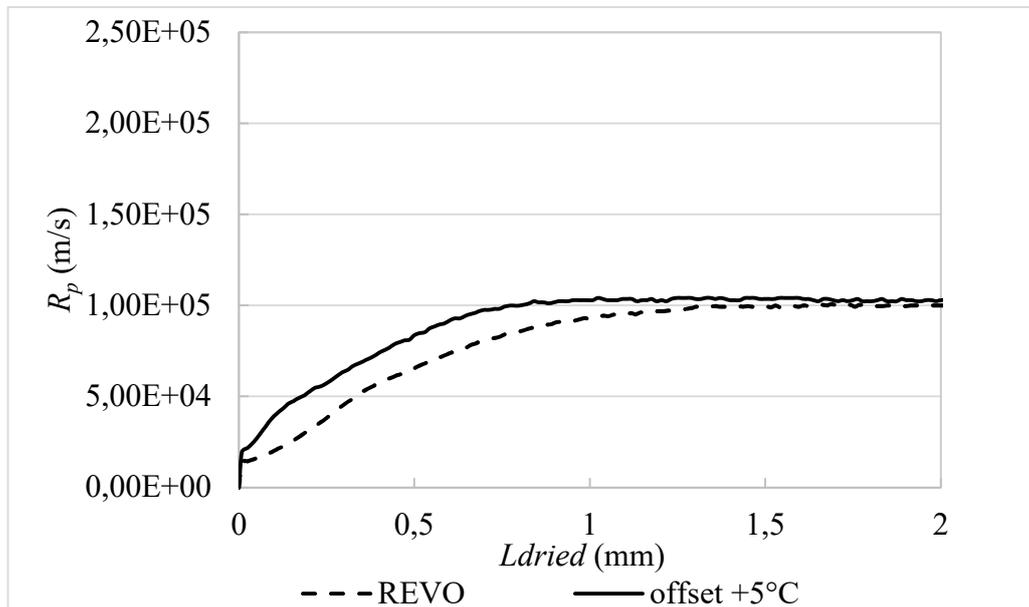


Figura 3.16 Confronto dei valori del parametro R_p ottenuto nel batch effettuato nel REVO e nel batch effettuato nel MicroFD per la simulazione dei flaconi laterali.

Anche in questo caso si ottengono dei profili molto simili tra loro, come ci si aspetta dall'osservazione dei profili di temperatura ottenuti durante la prova, riportati in figura 3.17.

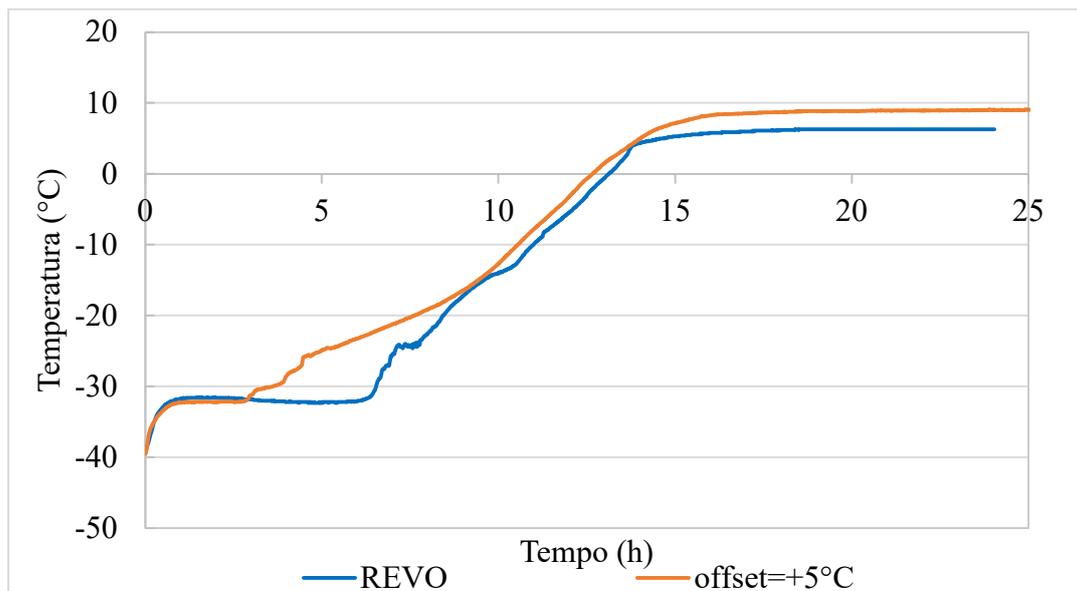


Figura 3.17 Confronto tra i profili di temperatura media dei flaconi esterni monitorati nel batch REVO e media totale dei flaconi monitorati nel MicroFD.

3.3 Controllo con logica *fuzzy*

In questo paragrafo vengono presentati i risultati ottenuti tramite l'analisi sperimentale dell'uso della logica *fuzzy* per il controllo dell'omogeneità del batch del MicroFD.

Per convalidare il sistema progettato sono state effettuate due prove in diverse condizioni di temperatura del ripiano e pressione della camera, utilizzando una soluzione acquosa di saccarosio al 5% in peso e i flaconi 20R.

Il controllo è stato svolto durante la fase dell'essiccamento primario, sino al raggiungimento dello stazionario, acquisendo i dati ogni 12 minuti per il loro inserimento nel programma Matlab creato e quindi effettuare il calcolo dell'*offset* richiesto.

3.3.1 $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$, $P_c = 90\text{mTorr}$

I due input del sistema di controllo sono la differenza di temperatura tra il prodotto nel flacone centrale e quello nei flaconi esterni monitorati, e la velocità di riscaldamento media totale del prodotto. In figura 3.18 vengono riportati i profili di temperatura medi del prodotto ottenuti durante la fase controllata, mentre in figura 3.19 è visibile l'andamento della velocità di riscaldamento nel tempo Q_R .

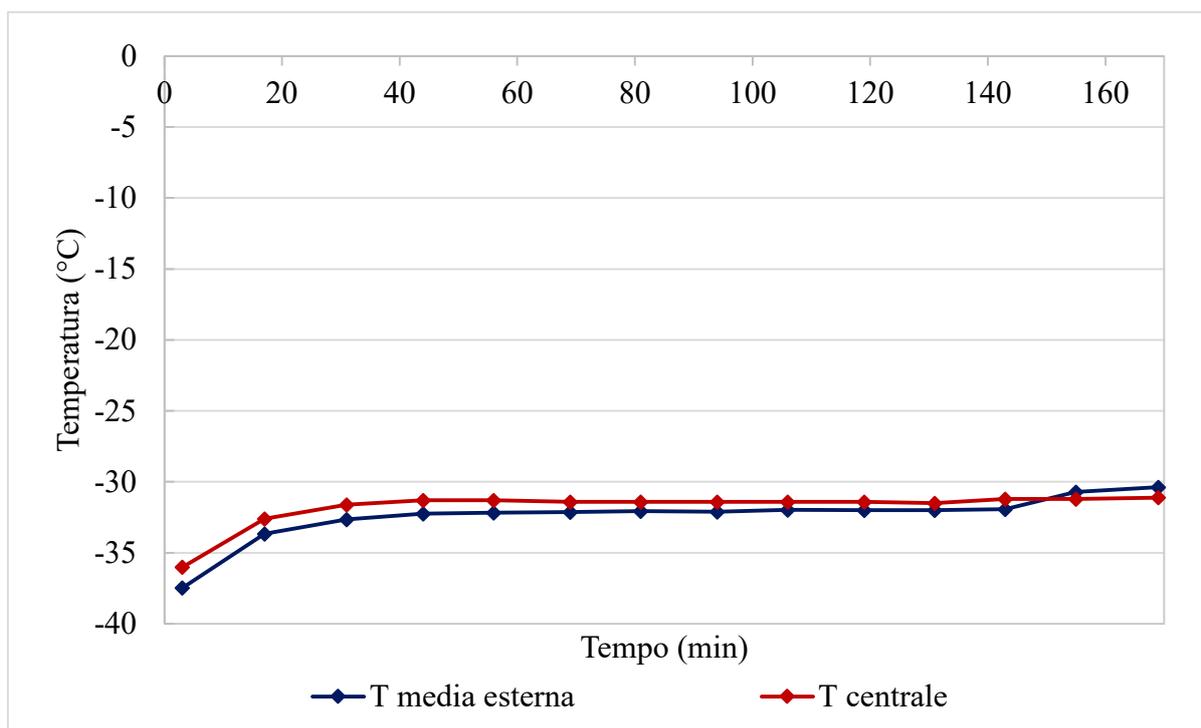


Figura 3.18 Profili di temperatura del prodotto e del *LyoSim* rilevati durante il controllo.

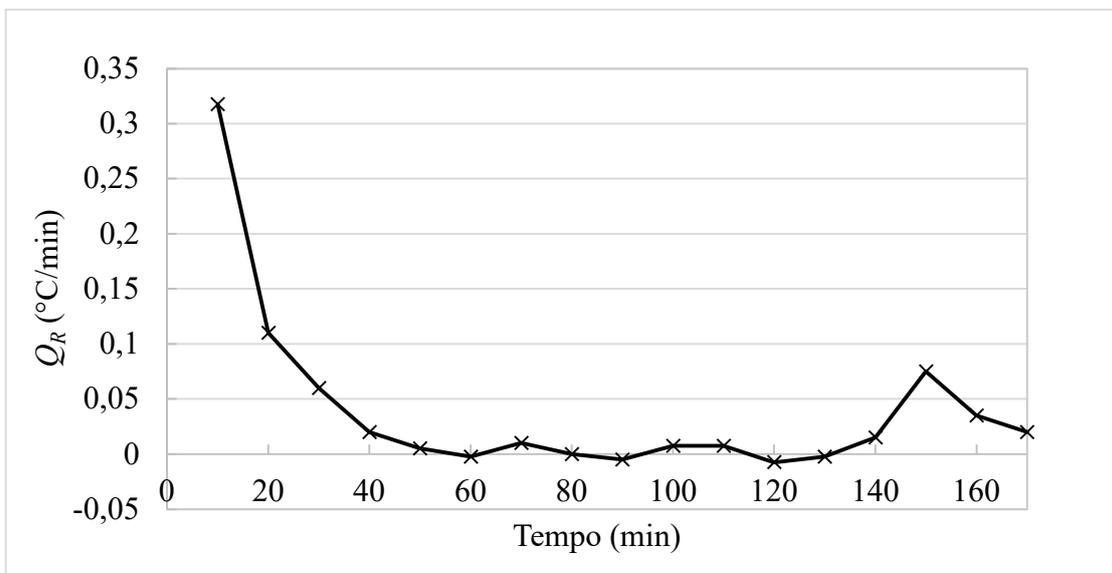


Figura 3.19 Velocità di riscaldamento del prodotto calcolata su un intervallo di 10 minuti durante la fase controllata.

Dall'osservazione dei profili di temperatura si nota che la differenza tra la temperatura nel flacone centrale e quella nei flaconi esterni monitorati risulta sempre molto bassa, nell'ordine di 1°C, e presenta il suo valore massimo nella parte iniziale dell'essiccamento primario: in questo momento la velocità di riscaldamento del prodotto è molto alta, ovvero il sistema ha una dinamica veloce; questa condizione permette l'utilizzo di bassi *offset* per il controllo, data la risposta veloce del sistema. Successivamente, in prossimità dello stazionario, la risposta del sistema è più lenta: è necessario applicare *offset* più elevati per il mantenimento della differenza di temperatura ottenuta precedentemente; inoltre, si nota che una volta raggiunto lo stazionario risulta difficile diminuire ulteriormente questa differenza. Quanto affermato è meglio osservabile nella figura 3.20.

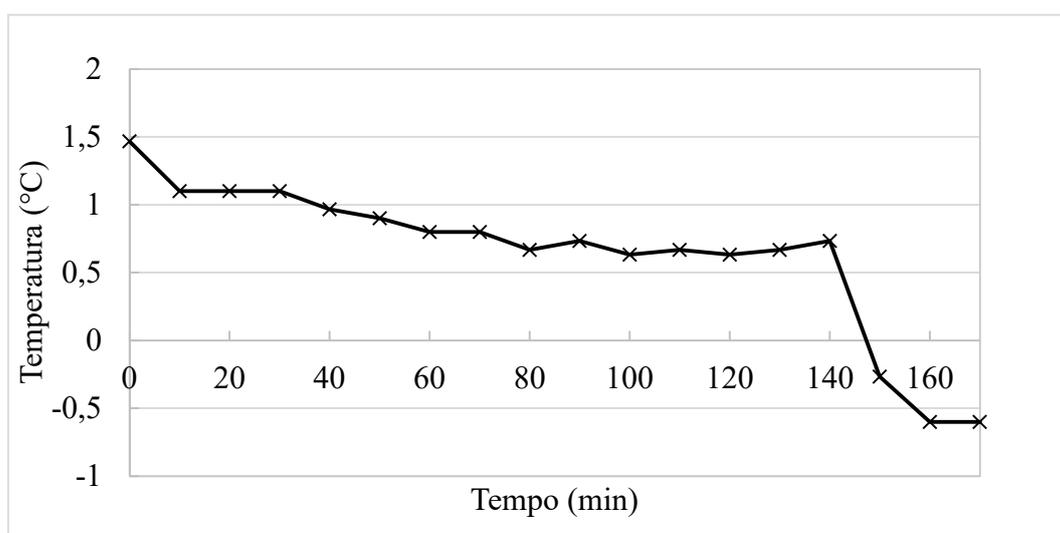


Figura 3.20 Differenza di temperatura tra il flacone interno e la media dei flaconi esterni monitorati.

Il valore dell'*offset* al tempo 0 è stato ipotizzato, essendo l'essiccamento primario appena iniziato: l'unica velocità calcolabile sarebbe stata quella relativa al minuto precedente, misura non disponibile. L'*offset* effettivamente applicato è leggermente diverso da quello calcolato poiché il sistema di controllo progettato non tiene conto della limitazione della temperatura dell'anello, che può essere impostata con una differenza fino a 15°C in valore assoluto rispetto alla temperatura di riferimento: sono stati quindi impostati i valori massimi ammessi quando l'*offset* calcolato è risultato essere più alto di quello applicabile. Nella fase finale del controllo si è cercato di riprodurre la richiesta del sistema di abbassare la temperatura del *LyoSim* abbassando l'*offset* rispetto a quello massimo consentito.

In generale, il sistema di controllo utilizzato è riuscito a mantenere al di sotto di 1°C la differenza di temperatura tra flacone interno e flaconi monitorati esterni: il programma è stato costruito avendo come obiettivo un valore pari a zero, ma l'incertezza data dall'utilizzo delle termocoppie per la misurazione della temperatura permette di considerare più che accettabile una differenza nell'ordine dell'unità, e ottima se al di sotto di 0.5°C in valore assoluto.

Osservando la figura 3.20, si può constatare che il controllo ha avuto un effetto apprezzabile solo nei primi 80 minuti, pari al tempo di raggiungimento dello stazionario; dopo, il suo valore non mostra cambiamenti sostanziali fino al minuto 140, in cui si ha un brusco abbassamento del ΔT dato da un repentino aumento della temperatura media dei flaconi esterni monitorati: questa condizione tuttavia è molto probabilmente dovuta al valore errato misurato da una delle termocoppie. In conclusione, si sarebbe potuta limitare la durata della fase di controllo, ottenendo gli stessi risultati.

3.3.2 $T_{shelf} = -20^{\circ}\text{C}$, $P_c = 60\text{mTorr}$

L'utilizzo di una temperatura più bassa rispetto al caso precedente comporta un'evoluzione del sistema più lenta; in figura 3.21 vengono riportati i profili di temperatura ottenuti durante il test, in figura 3.22 è visibile l'andamento della velocità nel tempo.

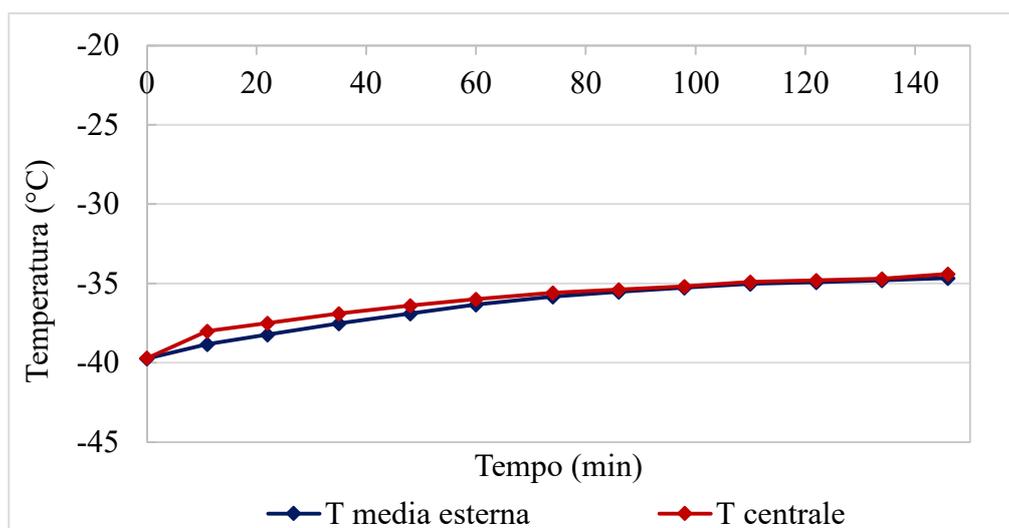


Figura 3.21 Profili di temperatura del prodotto e del *LyoSim* rilevati durante il controllo.

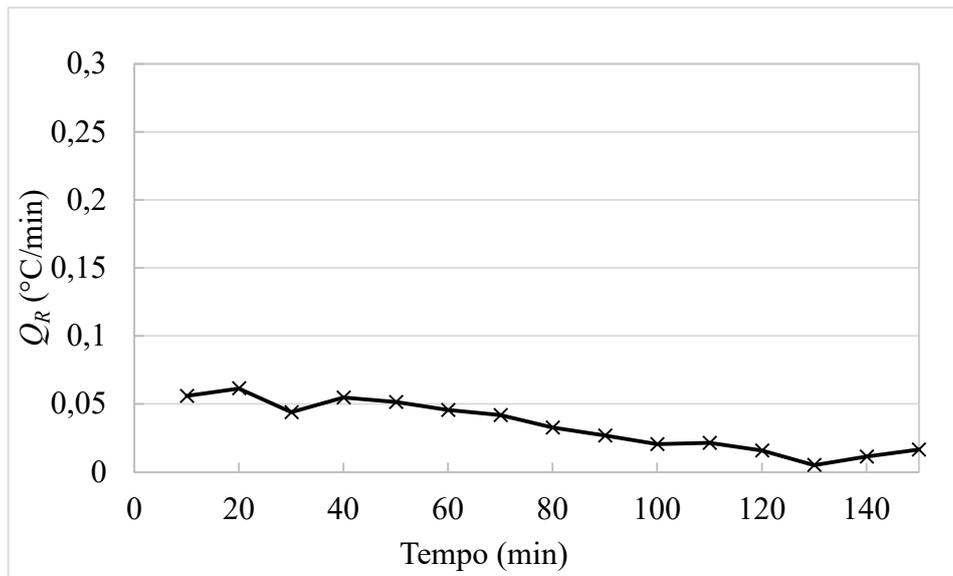


Figura 3.22 Velocità di riscaldamento del prodotto calcolata su un intervallo di 10 minuti durante la fase controllata.

Dall'analisi dei profili di temperatura e di velocità si nota che, rispetto al caso precedente, il raggiungimento dello stazionario è più lento e la velocità di riscaldamento del prodotto, soprattutto nella fase iniziale in cui è più alta, risulta essere più bassa. Questa situazione implica, da una parte, una risposta più lenta del sistema anche nella prima mezz'ora di essiccamento primario, in cui non si nota quindi un grosso effetto della variazione della temperatura del *LyoSim* sulla differenza di temperatura tra flacone centrale e flaconi esterni monitorati; d'altra parte, questa differenza è in generale più bassa, per cui il controllo della variabile considerata risulta più semplice e preciso rispetto al caso precedente.

La differenza di temperatura del prodotto tra flacone centrale e flaconi esterni monitorati è riportata nella figura 3.23.

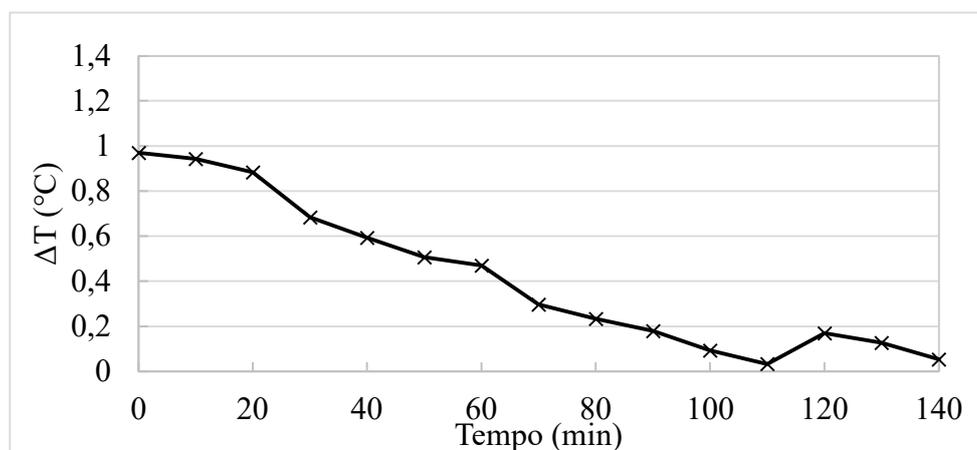


Figura 3.23 Differenza di temperatura tra il flacone interno e la media dei flaconi esterni monitorati.

Come osservabile in figura 3.21, lo stazionario viene raggiunto intorno al minuto 100: il controllo è stato effettuato per altre 2 ore, durante le quali non sono stati osservati cambiamenti apprezzabili nel ΔT del prodotto monitorato; vengono quindi riportati i risultati ottenuti nei primi 140 minuti, in cui si sono verificati i cambiamenti più significativi.

La differenza di temperatura tra prodotto nel flacone interno e quello nel flacone esterno si è mantenuta al di sotto di 0.5°C durante la maggior parte della prova: si è riusciti ad applicare un controllo più fine rispetto al caso precedente, grazie alla temperatura più bassa del ripiano.

4. Conclusioni

Nel presente lavoro di Tesi è stato impiegato un liofilizzatore di piccola scala, il MicroFD della Millrock Technologies, per la simulazione delle condizioni dei flaconi centrali e laterali di un liofilizzatore di scala pilota, il REVO: lo scopo è verificare la possibilità di utilizzare il MicroFD per condurre campagne sperimentali con il fine di identificare il valore del coefficiente di scambio di calore K_v e della resistenza al flusso di massa attraverso lo spessore dello strato secco R_p impiegando un ridotto numero di flaconi. Questo tipo di campagne sperimentali infatti può essere dispendioso sia in termini economici che in termini di tempo, e difficoltoso soprattutto in carenza di principio attivo; il MicroFD offre la possibilità di effettuare analisi su piccoli batch, costituiti da 7 flaconi 20R o 19 flaconi 6R, utilizzando un anello metallico, detto *LyoSim*, la cui temperatura può essere impostata come *offset* rispetto ad una temperatura di riferimento.

Sono stati condotti vari esperimenti nelle stesse condizioni di temperatura e pressione, variando solo la temperatura del *LyoSim*, per la determinazione del suo valore ottimale al fine di simulare la dinamica sia dei flaconi centrali sia di quelli laterali; nel caso dei flaconi 6R, sono stati utilizzati due batch con differenti condizioni di carico, al fine di studiare il cambiamento della dinamica dei flaconi in funzione del loro numero. In figura 4.1 vengono riportati i valori del parametro K_v medio ottenuto per gli *offset* considerati per i flaconi 6R, mentre in figura 4.2 vengono riportati quelli relativi ai flaconi 20R.

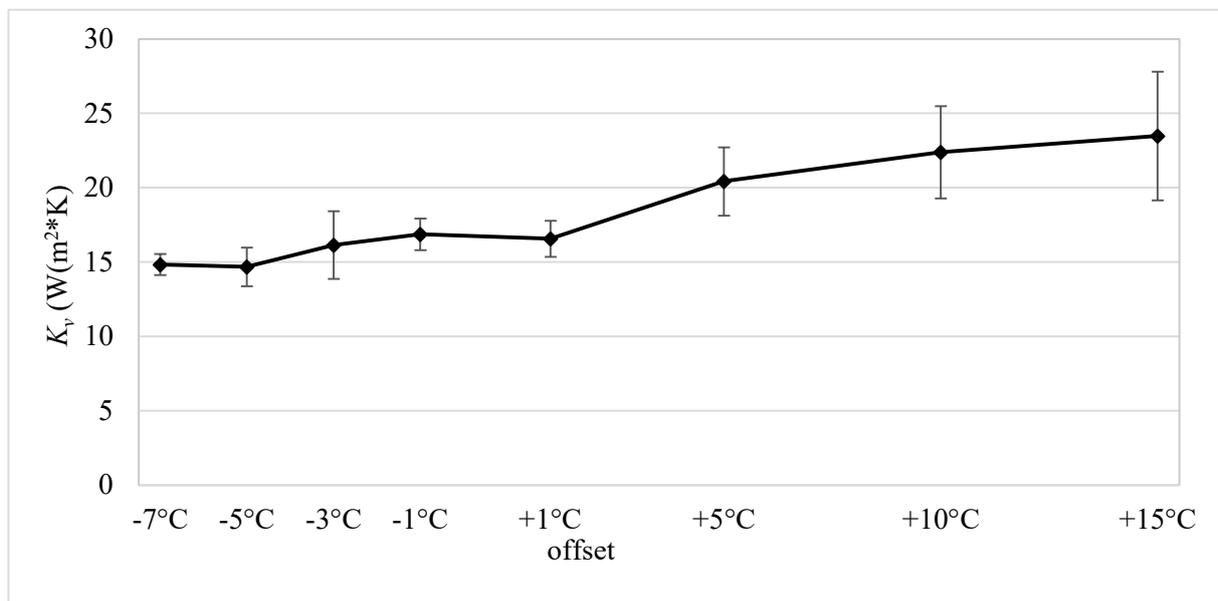


Figura 4.1 Confronto tra i valori del parametro K_v medio per ogni *offset* considerato, relativo ai flaconi 6R.

Osservando la figura 4.1 è evidente come sia stato necessario utilizzare *offset* molto alti per la simulazione dei flaconi esterni: ciò è dovuta alla presenza di un numero abbastanza grande di flaconi centrali, non a contatto con il *LyoSim* e quindi con una temperatura media e una perdita di massa più bassa; la loro presenza causa una diminuzione del K_v medio totale.

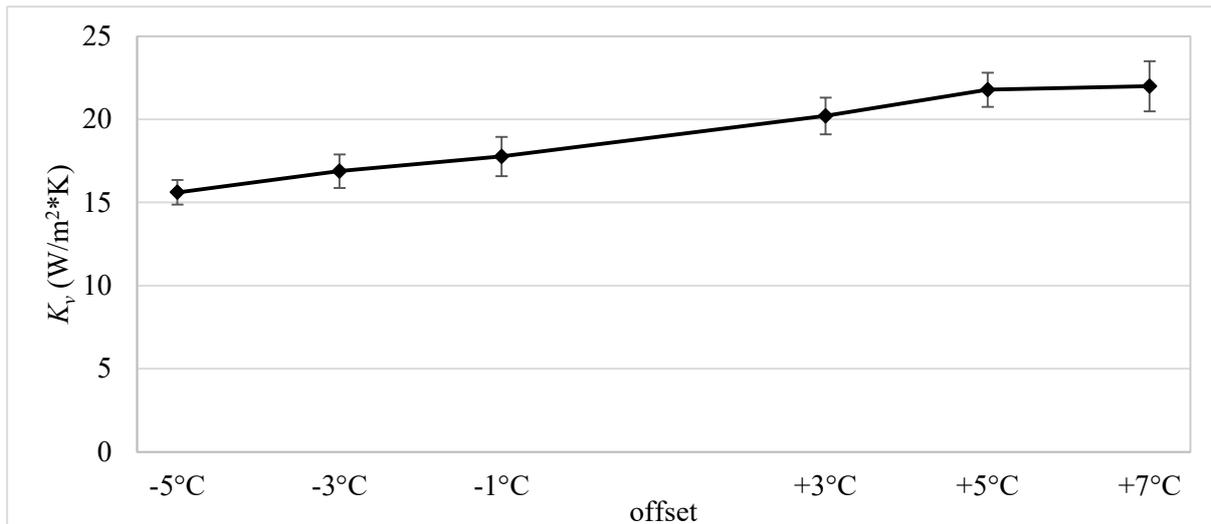


Figura 4.2 Confronto tra i valori del parametro K_v medio per ogni *offset* considerato, relativo ai flaconi 20R.

Utilizzando i flaconi 20R invece non è stato necessario utilizzare *offset* molto elevati per la simulazione dei flaconi esterni, in quanto nel batch è presente solo un flacone centrale, che ha un peso molto esiguo ai fini della valutazione del K_v medio totale.

Sono stati confrontati, oltre ai valori del coefficiente di scambio di calore relativo sia ai singoli flaconi che alla media totale calcolata per i flaconi interni e per quelli esterni, anche i profili di temperatura e i valori della resistenza R_p : in tutti i casi è stata dimostrata l'equivalenza dell'utilizzo del MicroFD e del REVO, sia per la simulazione dei flaconi centrali che di quelli laterali. Nel caso dei flaconi 6R sono stati ottenuti dei profili di R_p con valori di *plateau* leggermente diversi, ma comunque nello stesso ordine di grandezza: questa differenza può essere dovuta all'utilizzo del saccarosio, che tende a formare pori di differente dimensione al variare della temperatura; inoltre, l'entità della differenza può essere ritenuta trascurabile.

Nella prima parte del lavoro di Tesi si è proceduto mediante *Trial&Error* per la determinazione dei valori ottimali dell'*offset* da utilizzare nel MicroFD; è però possibile pensare di utilizzare una logica di controllo per la regolazione in automatico della temperatura del *LyoSim*, in modo da eliminare questa variabile nel set di esperimenti da effettuare. Nella seconda parte del lavoro è stata quindi utilizzata la logica *fuzzy* per la creazione di un sistema di controllo avente come unico obiettivo il mantenimento dell'omogeneità del batch durante l'essiccamento primario: esso ha come input la differenza di temperatura tra i flaconi interni e quelli esterni, monitorati con delle termocoppie, e la velocità di riscaldamento del prodotto relativa ad un intervallo di tempo scelto. Il sistema restituisce come *output* la differenza di temperatura finale e iniziale, rispetto all'intervallo di tempo, dell'anello *LyoSim*, ed esso viene trasformato sotto forma di *offset*.

Nonostante la presenza del limite di 15°C in valore assoluto per l'impostazione dell'*offset*, non considerato nel programma realizzato, il controllo della variabile input relativa all'omogeneità della temperatura del prodotto è andato a buon fine in entrambe le prove realizzate per la convalida del sistema, effettuate in diverse condizioni sia di temperatura del ripiano che di pressione della camera.

L'applicazione del sistema progettato nelle due prove effettuate ha permesso di concludere che:

- Il sistema è in grado di portare ad un valore molto basso la differenza tra la temperatura del flacone interno e quella media dei flaconi esterni;
- È necessario prestare attenzione ai valori delle temperature all'inizio dell'essiccamento primario, verificando che la temperatura rilevata nel flacone centrale sia minore rispetto alla media rilevata negli esterni;
- Potrebbe essere necessario impostare, all'inizio dell'essiccamento primario, un *offset* pari a zero, in modo da visualizzare l'effettiva dinamica del sistema, e imporre l'intervento del controllore solo quando la temperatura media dei flaconi esterni monitorati supera di 1°C quella rilevata nel flacone interno (essendo 1°C pari all'incertezza della misura della termocoppia).

Inoltre, è opportuno effettuare ulteriori test in diverse condizioni di temperatura e pressione, con differenti soluzioni ma soprattutto con diversi tipi di flaconi: nel caso di utilizzo dei flaconi 6R per esempio la temperatura interna risulta essere una media di quella rilevata nel flacone centrale e di quella rilevata nei flaconi della seconda fila, il che potrebbe portare all'ottenimento di risultati differenti rispetto a quanto ottenuto usando i flaconi 20R, in cui è presente un solo flacone centrale.

5. Bibliografia

- Abonyi J., 2003, *Fuzzy Model Identification for Control*, Birkhäuser, New York, USA.
- Brülls M. and Rasmuson A., 2002, Heat Transfer in Vial Lyophilization, *International Journal of Pharmaceutics*, **246**, 1-16.
- Fissore D., 2013, Freeze Drying of Pharmaceuticals, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Fourth Edition*, Taylor and Francis, New York, USA, 1723-1737.
- Fissore D., 2016, On the Design of a Fuzzy Logic-Based Control System for Freeze-Drying Processes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105**, 3562-3572.
- Fissore, D., 2017, Model-based PAT for Quality Management in Pharmaceuticals Freeze-drying: State of the Art, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **5**(5).
- Fissore D., Gallo G., Ruggiero A. E., and Thompson T. N., 2019, On the Use of a Micro Freeze-dryer for the Investigation of the Primary Stage of a Freeze-drying Process, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **141**, 121-129.
- Fissore D., Harguindeguy M., Velez Ramirez D., and Thompson T. N., 2020, Development of Freeze-Drying Cycles for Pharmaceutical Products Using a Micro Freeze-Dryer, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **109**(1), 797-806.
- Franks F. and Auffret T., 2008, *Freeze-frying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: Principles and Practice*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Giordano A., Barresi A.A., and Fissore D., 2011, On the Use of Mathematical Models to Build the Design Space for the Primary Drying Phase of a Pharmaceutical Lyophilization Process, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **100**(1), 311-324.
- Goldman J. M., Chen X., Register J. T., Nesarikar V., Iyer L., Wu Y., Mugheirbi N., and Rowe J., 2019, Representative Scale-Down Lyophilization Cycle Development Using a Seven-Vial Freeze-Dryer (MicroFD®), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**(4), 1486-1495.
- Kaleel A. H. and Mallick Z., 2012, Some Studies on Noise and Its Effects on Industrial/Cognitive Task Performance and Modeling, in *Fuzzy Inference System: Theory and Applications*, Chap. 9, ed. Azeem M. F., Intech, Rijeka, Croatia.
- Morais A. R. do V., Alencar É. do N., Xavier Júnior F. H., de Oliveira C. M., Marcelino H. R., Barratt G., Fessi H., do Egito E. S. T. and Elaissari A., 2016, Freeze-drying of Emulsified Systems: A Review, *International Journal of Pharmaceutics*, **503**(1-2), 102-114.
- Obeidat W.M., Sahni E., Kessler W., and Pikal M., 2018, Development of a Mini-Freeze Dryer for Material-Sparing Laboratory Processing with Representative Product Temperature History, *AAPS PharmSciTech*, **19**(2), 599-609.
- Passot S., Tréléa I.C., Marin M., and Fonseca F., 2010, The Relevance of Thermal Properties for Improving Formulation and Cycle Development: Application to Freeze-Drying of Proteins, in *Freeze-Drying/Lyophilization of pharmaceutical and Biological Products*,

- Third Edition*, Eds. Rey L. and May J.C., Chap.6, Informa Healthcare, London, UK, 136-166.
- Patel S.M., Doen T., and Pikal M. J., 2010, Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control, *AAPS PharmSciTech*, **11**(1), 73-84.
- Patel S. M. and Pikal M.J., 2011, Emerging Freeze-Drying Process Development and Scale-up Issues, *AAPS PharmSciTech*, **12**(1), 372-378.
- Pikal M. J., 1994, Freeze-Drying of Proteins: Process, Formulation, and Stability, in *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides* (ACS Symposium Series), Vol.567, Chap.8, Eds. Cleland J.L. and Langer R., American Chemical Society, Washington DC, USA, 120-133.
- Pisano R., Fissore D. and Barresi A.A., 2013, In-line and Off-line Optimization of Freeze-drying Cycles for Pharmaceutical Products, *Drying Technology*, **31**(8), 905-919.
- Rambhatla S. and Pikal M.J., 2003, Heat and Mass Transfer Scale-up Issues During Freeze Drying, I: Atypical Radiation and Edge Vial Effect, *AAPS PharmSciTech*, **4**(2), article 14.
- Rey L., 2010, Glimpses into the Realm of Freeze-Drying: Classical Issues and New Ventures, in *Freeze-Drying/Lyophilization of pharmaceutical and Biological Products, Third Edition*, Eds. Rey L. and May J.C., Chap.1, Informa Healthcare, London, UK, 1-28.
- Scutellà, B., Plana-Fattori A., Passot S., Bourlès E., Fonseca F., Flick D., and Trelea I. C., 2017, 3D Mathematical Modelling to Understand Atypical Heat Transfer Observed in Vial Freeze-drying, *Applied Thermal Engineering*, **126**, 226-236.
- Tang X.C. and Pikal M.J., 2004, Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice, *Pharmaceutical Research*, **21**(2), 191-200.
- Thompson T. N., Wang Q., and Reiter C., 2017, Developing Transferable Freeze-Drying Protocols using Accuflux and a MicroFD. Millrock Technology, Inc, San Diego, USA.
- Viktorov V. and Colombo F., 2016, *Automazione dei Sistemi Meccanici: Corso di base, Quarta Edizione*, C.L.U.T., Torino, Italia, 165-194.
- Wang W., 2000, Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, **203**(1-2), 1-60.
- Wang W., Chen M. and Chen G., 2012, Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **20**(3), 551-559.

6. Notazioni

a	Ampiezza della funzione di appartenenza, -
A_v	Area esterna del flacone, m^2
b	Parametro relativo alla forma della funzione di appartenenza, -
c	Centro della funzione di appartenenza, -
ΔH_s	Calore di sublimazione dell'acqua, $J\ kg^{-1}$
J_w	Flusso di materia, $kg\ m^{-2}\ s^{-1}$
J_q	Flusso di calore, $W\ m^{-2}$
$J_{q,shelf}$	Flusso di calore ricevuto dai flaconi per tramite del ripiano, $W\ m^{-2}$
K_v	Coefficiente di trasporto di calore globale, $W\ m^{-2}\ K^{-1}$
$K_{v,shelf}$	Coefficiente di scambio di calore calcolato dal MicroFD, $W\ m^{-2}\ K^{-1}$
L_{dried}	Spessore dello strato secco, m
L_{frozen}	Spessore dello strato congelato, m
Δm	Perdita di massa per sublimazione, kg
P_c	Pressione nella camera, Pa
$P_{w,c}$	Tensione di vapore dell'acqua nella camera, Pa
$P_{w,i}$	Tensione di vapore dell'acqua all'interfaccia di sublimazione, Pa
Q_R	Velocità di riscaldamento del prodotto, $^{\circ}C/min$
Q_{shelf}	Calore scambiato attraverso il ripiano, W
R_p	Resistenza al flusso di vapore, $m\ s^{-1}$
Δt	Intervallo di tempo per l'applicazione dell'output di controllo, s
$T_{avg,ext}$	Temperatura media rilevata nei flaconi esterni monitorati, $^{\circ}C$
T_B	Temperatura rilevata nel prodotto, $^{\circ}C$
T_{fluid}	Temperatura del fluido nel ripiano, $^{\circ}C$
T_{int}	Temperatura rilevata nel flacone interno, $^{\circ}C$
Δt_{prim}	Durata dell'essiccamento primario durante la prova, h
ΔT	Differenza di temperatura tra flacone interno e media dei flaconi esterni monitorati, $^{\circ}C$
ΔT_{ring}	Differenza della temperatura finale desiderata e quella iniziale effettiva del <i>LyoSim</i> riferita all'intervallo di controllo, $^{\circ}C$
$T_{ring,in}$	Temperatura del <i>LyoSim</i> al momento della misura, $^{\circ}C$

$T_{ring,fin}$	Temperatura del <i>LyoSim</i> attesa dopo l'intervallo di applicazione dell'offset calcolato, °C
T_{shelf}	Temperatura della superficie del ripiano, °C
X	Valore della variabile input, -

6.1 Grecismi

P_{frozen}	Densità del ghiaccio, kg m ⁻³
P_{dried}	Densità dello strato secco, kg m ⁻³

7. Ringraziamenti

Questo lavoro di Tesi è la chiusura di un percorso lungo e tortuoso, ma anche emozionante e sicuramente *life changing*. Non sarei mai arrivata alla fine senza il sostegno delle persone intorno a me.

Ringrazio il mio relatore, il professor Davide Fissore, per avermi fatto appassionare all'argomento e per essere stato sempre disponibile, nonostante le difficoltà portate dalla crisi sanitaria nazionale di questi mesi. Ringrazio la dottoranda Maitê Harguindeguy per i suoi preziosi consigli e la sua disponibilità.

Ringrazio i miei compagni di avventura: quelli presenti sin dalla triennale, Sara Florio, Sara Fontana, Cristina, Serena e Gaetano, e quelli conosciuti durante la magistrale, Giacomo, Gabriele e Carlotta, per aver condiviso con me la disperazione delle sessioni esami e la gioia della loro fine, le lunghe giornate di lezione, i progetti discussi al bar e qualche apericena improvvisato.

Ringrazio i miei "amici di giù", in particolar modo Stefano e Daniela, distanti ma sempre vicini.

Ringrazio Nelly, per essere stata una perfetta coinquilina e amica.

Ringrazio Rita, Bruno e Stefano, per i pranzi della domenica in famiglia con cui tornavo un po' alla normalità. Ringrazio Martina, che mi ha sostenuto con tisane a distanza e pinguini, ma soprattutto con tantissimi abbracci.

Ringrazio i miei padrini Speranza, Antioco, Massima e Giulio, mia nonna Maria e mio figlioccio Christian per avermi coccolata ogni volta che sono rientrata a casa.

Un ringraziamento speciale va alle tre persone che in assoluto mi hanno sostenuto più di tutte: la mia mamma, il mio papà e Francesco. La mia mamma, che tante volte mi ha aiutato fisicamente e psicologicamente durante le sessioni esami, e che mi è stata tanto vicina anche quando la distanza ci ha tenuto separate. Il mio papà, che tante volte si è messo a studiare e a ragionare con me, e mi ha dato sempre "forza e coraggio". Francesco, che ogni giorno mi ha sopportato e supportato, che mi ha consolato nei momenti di difficoltà e che ha festeggiato con me ogni singolo traguardo raggiunto. Grazie per non aver mai smesso di credere in me.