

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

Uso della termografia per il monitoraggio del processo di liofilizzazione



Relatori

prof. Davide Fissore
dott. Domenico Colucci

Candidato

Riccardo Maniaci

Marzo 2019

Indice

1 Introduzione	5
1.1 Il processo di liofilizzazione	5
1.2 La fase di congelamento	7
1.3 La termografia come Process Analytical Technology (PAT).....	12
1.4 Scopo del lavoro	15
2 Metodologie sperimentali e di calcolo	17
2.1 Termocamera	17
2.2 Misura dell'emissività del vetro dei flaconi	18
2.3 Convalida della misura di temperatura della termocamera	20
2.4 Calcolo di R e G dalle immagini della termocamera	23
2.5 Stima del diametro dei cristalli e della resistenza al trasporto di materia.....	24
2.6 Design degli esperimenti	26
2.7 Convalida dell'approccio utilizzato	29
3 Risultati	31
3.1 Verifica della ripetibilità delle misure effettuate nelle varie prove	31
3.2 Valutazione di D_p ottenuto per le diverse formulazioni.	34
3.3 Valutazione di R_p	43
3.4 Confronto tra risultati sperimentali e quelli calcolati con il modello di essiccamento primario.....	50
4 Conclusioni	57
<i>Lista simboli</i>	59
<i>Riferimenti bibliografici</i>	61

1 Introduzione

Il presente lavoro di Tesi si focalizza sul monitoraggio della fase di congelamento del processo di liofilizzazione. A tale scopo verrà utilizzata una termocamera a raggi infrarossi (IR) che, combinata con l'applicazione di un modello matematico, consente di caratterizzare la struttura del prodotto formatasi durante il congelamento.

In questo primo capitolo si fornirà pertanto un breve inquadramento generale del processo di liofilizzazione, seguito da una trattazione più specifica della fase di congelamento e del monitoraggio tramite termografia.

1.1 Il processo di liofilizzazione

Il processo di liofilizzazione è largamente utilizzato per l'essiccamento di prodotti deperibili e ad alto valore aggiunto, principalmente alimenti e prodotti farmaceutici (Fissore, 2013). Questa tecnica consente infatti di abbassare il contenuto di umidità residua a livelli tali da consentire la conservazione per lunghi periodi, e ridurre notevolmente anche i costi di trasporto. Un significativo vantaggio della liofilizzazione rispetto alle altre tecniche di essiccamento consiste nella possibilità di rimuovere l'acqua a bassa temperatura, quindi minimizzando gli stress per prodotti termolabili. Nel caso di alimenti, questo consente di preservare le proprietà organolettiche, mentre per quanto riguarda i prodotti farmaceutici è possibile aumentare considerevolmente la *shelf life* senza compromettere il potere terapeutico del principio attivo.

La liofilizzazione consiste di tre fasi, ovvero congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario, che verranno dettagliate meglio nel seguito.

Congelamento: durante questa prima fase la temperatura del prodotto viene abbassata (linea 1 in Figura 1.1) in modo da consentire il completo congelamento dell'acqua libera. Esistono diversi protocolli per congelare il prodotto, che differiscono per velocità, mezzo refrigerante, possibilità di controllo di *cooling rate* e/o della temperatura di nucleazione ecc. Poiché questo lavoro di Tesi si concentrerà in maniera specifica sul processo di congelamento, un capitolo a parte verrà dedicato nel seguito alla descrizione nel dettaglio delle problematiche e del ruolo di questa fase nell'ambito del processo di liofilizzazione.

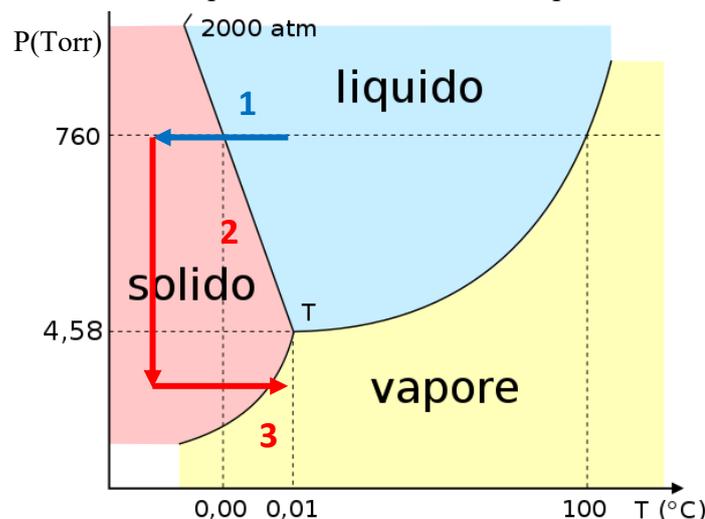


Figura 1.1: Diagramma di stato dell'acqua.

Da https://it.wikipedia.org/wiki/File:Diagramma_di_fase_acqua.svg (accesso 4/01/2019), con modifiche.

Essiccamento primario: al termine della fase di congelamento la pressione all'interno del liofilizzatore viene abbassata (linea 2 in Figura 1.1) al di sotto del punto triplo dell'acqua, e la temperatura aumentata (linea 3 in Figura 1.1) in modo da consentire la rimozione dell'acqua congelata tramite sublimazione. Durante l'essiccamento primario è necessario fornire costantemente calore al prodotto per compensare l'endotermicità della sublimazione. La forza spingente per la rimozione dell'acqua durante l'essiccamento primario è rappresentata dalla differenza di pressione parziale del vapore tra l'interfaccia di sublimazione p_{wi} e la camera di liofilizzazione p_{wc} . Nella liofilizzazione sotto vuoto la riduzione della pressione parziale del vapore in camera viene realizzata abbassando la pressione totale, attraverso un sistema formato da condensatore, per il vapore d'acqua, e pompa ad anello liquido, per la rimozione degli incondensabili. È anche possibile, però, effettuare l'essiccamento primario in condizioni atmosferiche, abbassando la pressione parziale del vapore acqueo in camera tramite un flusso di gas a bassissimo contenuto di umidità (Fissore *et al.*, 2013).

Il flusso di vapore J_w è in ogni caso anche funzione della morfologia del prodotto, tenuta in conto dalla resistenza al trasporto R_p , come descritto in Equazione 1.1 (Fissore e Pisano, 2015),

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{wi} - p_{wc}) \quad (1.1)$$

L'essiccamento primario è in genere la fase più lunga del processo di liofilizzazione ed un parametro che necessita di essere strettamente controllato in questo stadio è la temperatura del prodotto. È infatti assolutamente necessario evitare il superamento di una temperatura critica, nota come temperatura di collasso, raggiunta la quale si verifica la perdita della struttura del prodotto essiccato. La conseguenza è, pertanto, la perdita delle proprietà estetiche del prodotto, ed il rischio è che quest'ultimo non sia più accettabile da un punto di vista commerciale. Inoltre, prodotti collassati mostrano spesso un contenuto di umidità residua superiore al livello richiesto per una buona conservazione a lungo termine. Per prodotti cristallini la temperatura limite è la temperatura eutettica, mentre nel caso di formulazioni amorfe la temperatura limite è spesso vicina alla temperatura di transizione vetrosa (Pikal 1990a, 1990b). Spesso per aumentare la temperatura di collasso del prodotto, e consentire quindi di svolgere l'essiccamento primario a temperature più elevate e in tempi più brevi, vengono aggiunti alla formulazione dei particolari componenti, noti come *bulking agents*, ad esempio mannitolo e glicina.

Nel caso della liofilizzazione sottovuoto investigata durante questo lavoro di Tesi il prodotto viene congelato ed essiccato all'interno di flaconi appoggiati sui ripiani di un liofilizzatore, all'interno dei quali circola un fluido tecnologico. Lo scambio termico col prodotto durante l'essiccamento primario è quindi somma di diversi contributi: contatto col ripiano, conduzione e convezione nel gas e irraggiamento. Tali contributi vengono generalmente considerati con un fattore di scambio globale K_v (Fissore e Pisano, 2015). Il flusso di calore J_q è pertanto funzione della differenza di temperatura tra il fluido T_f e la base del flacone T_b , secondo l'equazione seguente:

$$J_q = K_v (T_f - T_b) \quad (1.2)$$

Essiccamento secondario: in quest'ultima fase del processo di liofilizzazione si verifica la rimozione per desorbimento dell'acqua legata, descrivibile, ad esempio, mediante l'equazione seguente:

$$\frac{dC_w}{dt} = -k_d(C_w - C^\circ) \quad (1.3)$$

dove k_d è la costante di desorbimento, C_w la concentrazione di umidità residua nel prodotto e C° è il contenuto di acqua all'equilibrio (Pikal *et al.*, 1990).

L'essiccamento secondario si realizza aumentando la temperatura del prodotto e, spesso, abbassando ulteriormente il livello di pressione in camera. In genere questa seconda fase di essiccamento è più breve della precedente ed il parametro di maggiore importanza è il contenuto di umidità residua finale che, per molte applicazioni, deve essere portata al di sotto di un livello critico. Per esempio, è stato riportato in letteratura che il contenuto di acqua in una formulazione liofilizzata non dovrebbe eccedere il 2% (Daukas e Trappler, 1998). A volte però è stato anche osservato che l'*over-drying* può essere dannoso per prodotti particolarmente sensibili, quali i farmaci a base proteica (Hsu *et al.*, 1992).

1.2 La fase di congelamento

In questa sezione ci si concentrerà in particolare sulla prima fase della liofilizzazione, ovvero il congelamento, che sarà al centro del lavoro di Tesi. Come accennato, il processo di congelamento può essere effettuato usando diversi protocolli. Il metodo sicuramente più rapido prevede l'immersione in azoto liquido, e talvolta vengono anche utilizzati flussi di gas a bassa temperatura, per indurre la rapida formazione di ghiaccio all'interno del prodotto. Tuttavia, in questo lavoro ci si focalizzerà sul metodo di congelamento più diffuso, soprattutto in ambito farmaceutico, noto come *shelf-ramped freezing* (Kasper e Friess, 2011). Durante lo *shelf-ramped freezing* la temperatura del prodotto, appoggiato sui ripiani del liofilizzatore, viene abbassata gradualmente riducendo la temperatura del fluido tecnologico, in genere fino a valori di $-40/-50^\circ\text{C}$. Questa tecnica consente un controllo accurato del *cooling rate*, ovvero della velocità di raffreddamento imposta al fluido tecnologico, e quindi alla formulazione. Un esempio di profilo temperatura-tempo durante *shelf-ramped freezing* è mostrato in Figura 1.2.

Inizialmente la formulazione liquida si raffredda al di sotto della temperatura di congelamento. Questa è una situazione metastabile, in cui il congelamento ancora non si verifica per ragioni di tipo cinetico. Quando il livello di sotto-raffreddamento è sufficientemente elevato da consentire il superamento della barriera termodinamica per la formazione dei primi nuclei di ghiaccio, avviene il fenomeno della nucleazione (indicata con un asterisco in Figura 1.2). A questo punto la temperatura del prodotto sale rapidamente, portandosi vicina al valore di equilibrio, perché la formazione di ghiaccio è un processo esotermico. Il fronte di congelamento si muove poi gradualmente all'interno del prodotto e, in una prima fase, la temperatura non varia in maniera significativa in quanto la rimozione di calore attraverso il fluido tecnologico controbilancia quasi esattamente il processo esotermico di cristallizzazione. Successivamente, quando la maggior parte dell'acqua libera è congelata, la temperatura del prodotto decresce in maniera rapida, raggiungendo infine uno stazionario.

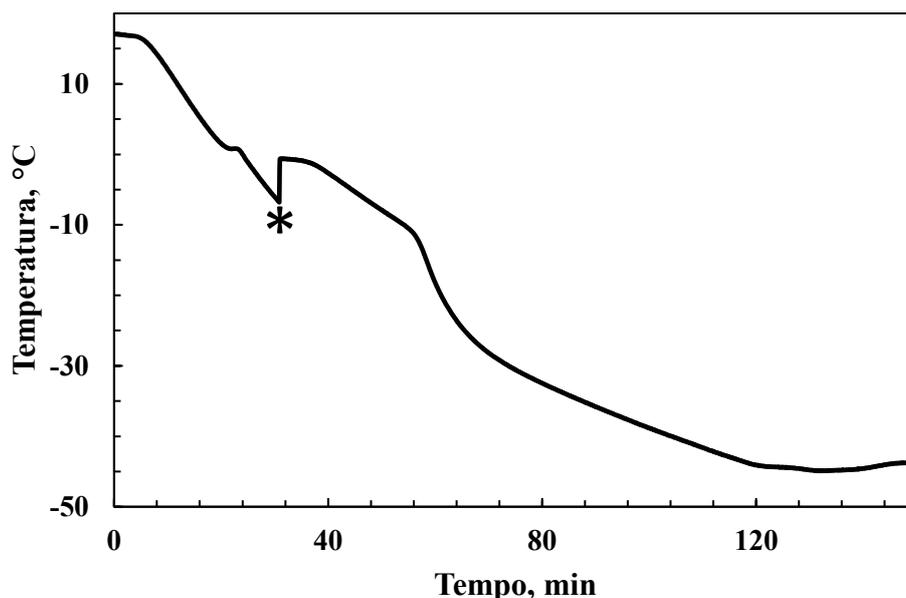


Figura 1.2: Esempio di profilo temperatura-tempo durante *shelf-ramped freezing*.

La fase di congelamento svolge un ruolo fondamentale all'interno del processo di liofilizzazione in quanto determina la struttura del prodotto (Hottot *et al.*, 2007). Una delle variabili di maggiore interesse è la dimensione dei cristalli di ghiaccio che si formano durante il processo (Arsiccio *et al.*, 2017). Infatti, se il prodotto non subisce collasso, il diametro dei cristalli di ghiaccio D_p coincide con la dimensione dei pori formati nel prodotto essiccato. Pori di grossa dimensione risultano in una bassa resistenza al trasporto di vapore per sublimazione, R_p , e accelerano quindi il processo di essiccamento primario (Searles *et al.*, 2001). Viceversa, la velocità di desorbimento è penalizzata dalla riduzione della superficie specifica (SSA) che si verifica in presenza di elevati valori di D_p (Oddone *et al.*, 2017). La morfologia del prodotto è quindi di fondamentale importanza per l'efficienza del processo di liofilizzazione, ma è anche legata alla qualità del prodotto. Infatti, pori di piccola dimensione facilitano il raggiungimento di temperature elevate durante l'essiccamento primario e, quindi, rendono più facile l'indesiderato superamento della temperatura di collasso. Inoltre, nel caso di prodotti sensibili a denaturazione interfacciale, come le proteine, la formazione di piccoli cristalli di ghiaccio aumenta in maniera considerevole i fenomeni di *unfolding* e aggregazione (Bhatnagar *et al.*, 2008). Infine, la morfologia del prodotto influenza anche sensibilmente il tempo di ricostituzione di formulazioni ad elevata concentrazione, e ciò può avere importanza critica in alcune applicazioni (Geidobler *et al.*, 2013).

Le variabili che maggiormente influiscono sulla dimensione dei cristalli di ghiaccio, e quindi dei pori del prodotto secco, sono il *cooling rate* e la temperatura di nucleazione T_n (Nakagawa *et al.*, 2007). Elevati *cooling rate* e basse temperature di nucleazione favoriscono la formazione di cristalli di piccola dimensione, come schematicamente mostrato in Tabella 1.1.

Tabella 1.1. Schema dell'effetto di *cooling rate* e temperatura di nucleazione T_n .

	↓Cooling rate ↑ T_n	↑ Cooling rate ↓ T_n
D_p	↑	↓
Sublimazione	↑	↓
Desorbimento	↓	↑
Denaturazione superficiale	↓	↑
Tempo di ricostituzione	↓	↑

Mentre, come accennato, il *cooling rate* può essere controllato durante il *shelf-ramped freezing*, la temperatura di nucleazione è invece generalmente distribuita in maniera stocastica all'interno del *batch*. Per ovviare a questo problema, nel corso degli anni sono state sviluppate alcune tecniche che consentono di controllare la temperatura di nucleazione, ovvero fare avvenire la nucleazione alla temperatura desiderata. L'obiettivo finale è, da un lato, migliorare l'omogeneità del *batch* e, dall'altro, indurre la formazione di cristalli di grosse dimensioni che permettano di ridurre i tempi di essiccamento primario. Tra le possibili alternative citiamo le seguenti:

- **Electrofreezing:** in questo caso si usa un impulso elettrico ad alto voltaggio per indurre la nucleazione in acqua sottoraffreddata (Petersen *et al.*, 2006). Questa tecnica prevede la presenza di componenti aggiuntivi all'interno del liofilizzatore, che comportano costi di installazione e sono scarsamente compatibili con i requisiti di sterilità generalmente richiesti;
- **Addizione di impurezze:** delle impurezze, quali ad esempio ioduro d'argento o batteri come *Pseudomonas syringae*, vengono aggiunte alla soluzione consentendo di aumentare la temperatura di nucleazione. Quest'ultima però, non è soggetta ad un vero e proprio controllo e continua ad essere stocasticamente distribuita all'interno del *batch* (Searles *et al.*, 2001a, Weng *et al.*, 2017);
- **High-pressure shift:** la camera di liofilizzazione è prima pressurizzata a valori di 1.5-4.5 bar e poi rapidamente depressurizzata. Ciò induce nucleazione nel prodotto precedentemente sottoraffreddato. Tuttavia, l'applicazione di questo metodo è limitata a liofilizzatori capaci di sopportare la sovrappressione richiesta per indurre la nucleazione (Bursac *et al.*, 2009);
- **Tecnica ice-fog:** in questo caso delle piccole particelle di ghiaccio, generate dal rilascio di azoto o altro gas a bassa temperatura all'interno della camera di liofilizzazione, penetrano nei flaconi svolgendo il compito di agenti di nucleazione (Patel *et al.*, 2009, Geidobler *et al.*, 2012). Non è chiaro tuttavia se, nel caso di *batch* di grossa dimensione, questa tecnica consenta di indurre simultaneamente la nucleazione in tutti i flaconi;

- **Tecnica ad ultrasuoni:** la nucleazione è indotta dall'uso di ultrasuoni che promuovono la formazione di bolle di cavitazione (Inada *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2001). Il vantaggio di tale tecnica è legato alla sua non invasività. Tuttavia, è richiesta l'installazione di componenti aggiuntivi nel liofilizzatore, e non è chiaro se le alte temperature raggiunte localmente a seguito della cavitazione, e la stessa formazione di bolle, possano danneggiare prodotti particolarmente sensibili;
- **Vacuum induced nucleation:** questa tecnica si realizza abbassando la pressione in camera a valori in genere compresi tra 1 e 2 mbar (Kramer *et al.*, 2002). Ciò induce una forte evaporazione dal prodotto sottoraffreddato, che causa una significativa riduzione di temperatura e conseguente nucleazione. In questo caso non è richiesta la presenza di componenti aggiuntivi nel liofilizzatore, ma il prodotto finale potrebbe mostrare difetti estetici a seguito dell'abbassamento di pressione. Questi difetti possono essere però minimizzati chiudendo la valvola di collegamento tra camera e condensatore subito dopo aver indotto la nucleazione in tutti i flaconi (Oddone *et al.*, 2014).

Un'altra possibilità per favorire la formazione di cristalli di grossa dimensione consiste nell'aggiungere una fase di *annealing*, in cui il prodotto congelato viene portato ad una temperatura superiore alla temperatura di transizione vetrosa per un periodo di tempo sufficiente a consentire la maturazione di Ostwald dei cristalli più grossi a spese di quelli piccoli (Searles *et al.*, 2001b).

Considerata l'importanza del processo di congelamento, numerose tecniche sono state utilizzate in letteratura allo scopo di caratterizzare l'effetto che questo ha sulla morfologia del prodotto. Ad esempio, la microscopia elettronica a scansione (SEM) può essere combinata con tecniche di analisi di immagine per determinare la dimensione dei pori in prodotti liofilizzati (Grassini *et al.*, 2016, Arsiccio *et al.*, in stampa). La tecnica SEM consente anche la determinazione dell'eterogeneità nella dimensione dei pori all'interno del singolo flacone, e può essere usata *off-line*. Ciò rappresenta un vantaggio, in quanto non è richiesta l'introduzione di sensori aggiuntivi all'interno del liofilizzatore.

Un'altra tecnica che può essere utilizzata *off-line* è la BET (Brunauer–Emmett–Teller), che consente di misurare l'area superficiale, SSA, del prodotto liofilizzato. Da quest'ultima è possibile poi risalire anche alla dimensione dei pori secondo l'equazione seguente (Rambhatla *et al.*, 2004)

$$SSA = \frac{n_p D_p l \pi}{\rho_s V_s} \quad (1.4)$$

dove si è assunto che gli n_p pori siano cilindri di lunghezza l in un solido di densità ρ_s e volume V_s .

Infine, la tomografia micro-computerizzata a raggi X (X-ray micro-CT) può essere utilizzata per determinare la distribuzione dei pori all'interno del prodotto, e quindi la resistenza al trasporto di materia (Pisano *et al.*, 2017).

Accanto agli approcci sperimentali sono anche stati sviluppati dei metodi predittivi, basati sull'applicazione di un modello o di una legge empirica, che consentono la determinazione del diametro dei pori nel prodotto liofilizzato a partire dalla conoscenza di alcune variabili di processo. In particolare, è stato osservato che la velocità di avanzamento del fronte di

congelamento R ed i gradienti di temperatura nella zona congelata G contribuiscono in maniera determinante alla morfologia del prodotto liofilizzato. Pertanto, la maggior parte degli approcci predittivi (Bomben e King, 1982, Kochs *et al.*, 1991, Kurz e Fischer, 1992, Nakagawa *et al.*, 2007) si basa sull'utilizzo di queste variabili, spesso elevate ad opportuni esponenti λ_1 e λ_2 determinati empiricamente, secondo la seguente legge di potenza,

$$D_p = \alpha R^{-\lambda_1} G^{-\lambda_2} \quad (1.5)$$

dove α è un coefficiente di proporzionalità che dipende da prodotto, applicazione e condizioni di processo. I valori degli esponenti λ_1 e λ_2 utilizzati in letteratura, con dettagli sulla relativa applicazione, sono riassunti in Tabella 1.2.

Tabella 1.2. Schema delle leggi empiriche proposte in letteratura per il calcolo di D_p .

Applicazione	λ_1	λ_2
Solidificazione di metalli a bassa velocità (Kurz e Fischer-1 1992)	1	1
Solidificazione di metalli a bassa velocità (Kurz e Fischer-2 1992)	0.5	0
Congelamento di mele (Bomben e King 1982)	0.5	0.5
Solidificazione di leghe ad alta velocità (Kochs <i>et al.</i> 1991)	0.25	0.5
Congelamento di soluzioni farmaceutiche (Nakagawa <i>et al.</i> 2007)	0.5	0.5

Accanto alle leggi empiriche precedentemente citate, è anche riportato in letteratura un modello meccanicistico per la predizione del diametro dei cristalli in prodotti poi liofilizzati (Arsiccio *et al.*, 2017). Questo modello, che combina bilanci di materia ed energia all'interno di un flacone di diametro D sottoposto a congelamento, giunge alla formulazione di due equazioni, di validità generale nel caso di Equazione 1.6, oppure limitata al caso di soluzioni diluite nel caso di Equazione 1.7,

$$D_{p,i} = \frac{16mG_i \gamma b R_i}{\rho_{ice} G_i^{2/3} (4mG_i R_i \Delta H_f - k_s G_i D^2 \pi \Delta z \sum_{i=1}^n G_i - 4\pi \Delta^2 z \sum_{i=1}^n G_i D h \Delta T)} \quad (1.6)$$

$$D_{p,i} = \frac{4\epsilon \gamma b R_i}{(\epsilon \rho_{ice} R_i \Delta H_f - k_s G_i) G_i^{2/3}} \quad (1.7)$$

Il modello discretizza il prodotto sottoposto a congelamento in $i=1,2\dots n$ strati di altezza Δz , per ognuno dei quali calcola i valori di velocità di avanzamento del fronte di congelamento R_i e i gradienti di temperatura nella zona congelata G_i . I contributi termici considerati sono:

- il calore di cristallizzazione del ghiaccio, descritto dall'entalpia latente di congelamento ΔH_f ;
- il cambio entalpico legato alla formazione dell'interfaccia acqua-ghiaccio, descritto dalla tensione interfacciale solido-solido γ e dal fattore di forma b . Quest'ultimo termine, di difficile valutazione sperimentale, è determinato empiricamente e cambia al variare della formulazione, ma è indipendente dal contenuto di solido e dalle condizioni di processo;
- il calore rimosso attraverso il prodotto già congelato, avente densità ρ_{ice} e conducibilità k_s ;
- la portata termica trasferita attraverso la parete laterale del flacone. Quest'ultimo contributo è legato alla differenza di temperatura ΔT tra il prodotto e l'aria all'interno del liofilizzatore, ed avviene con velocità descritta dal coefficiente di scambio globale h . Poiché quest'ultimo termine è in genere trascurabile rispetto ai precedenti, viene trascurato in Equazione 1.7.

Infine, il modello assume che, alla fine del processo, una massa m di acqua abbia subito congelamento, e che vi sia un rapporto ε tra il volume di ghiaccio ed il volume totale del sistema.

In letteratura i valori di R e G sono stati finora ricavati attraverso l'applicazione di un modello matematico (Nakagawa *et al.*, 2007, Pisano e Capozzi, 2017). In questo lavoro di Tesi queste variabili verranno invece misurate direttamente durante il processo di congelamento attraverso l'uso di una termocamera a raggi infrarossi. Nel seguente paragrafo verranno pertanto brevemente descritti i vantaggi e principi fondamentali della termografia come tecnica di monitoraggio nell'ambito del processo di liofilizzazione.

1.3 La termografia come Process Analytical Technology (PAT)

Il calcolo di R e G è possibile una volta che siano noti i profili di temperatura lungo il prodotto durante il processo di congelamento. In passato sono state proposte diverse tecnologie di monitoraggio (PAT) con lo scopo di valutare *in-line* l'evoluzione del processo e verificare che le caratteristiche desiderate siano state ottenute (Fissore *et al.*, 2018). Alcune tra le PAT proposte in letteratura si basano sul monitoraggio della temperatura del prodotto. A questa categoria appartengono:

- **Termocoppie:** sono molto utilizzate su scala di laboratorio (Fissore *et al.*, 2017), e l'accuratezza della misura dipende anche dalle dimensioni del sensore. Infatti, se molto sottile, l'estremità del sensore fornisce valori di misura locale molto accurati, ma estremamente sensibili a piccoli spostamenti. Al contrario, dimensioni maggiori risultano in una misura più robusta, ma meno accurata (Nail *et al.*, 2017). Le termocoppie sono strumenti di misura a carattere invasivo, in quanto vengono inserite all'interno del flacone contenente il prodotto. Per tale ragione possono compromettere la sterilità e non sono pertanto compatibili con condizioni di processo GMP (*Good Manufacturing Practice*). Inoltre, le termocoppie poste all'interno di un flacone possono agire da siti di nucleazione eterogenea, abbassando la barriera energetica alla formazione di cristalli, e promuovendo temperature di nucleazione più elevate. I flaconi contenenti termocoppie non possono

pertanto riprodurre fedelmente il comportamento di una soluzione in condizioni non perturbate;

- **Resistance thermal detector (RTD)**: si tratta di sensori simili alle termocoppie, ma più robusti e sterilizzabili (Oetjen e Haseley, 2004, Willemer, 1991). Vengono usati anche su scala industriale, sebbene le loro grosse dimensioni possano condizionare la misura (Presser, 2003);

- **Optical fiber sensor (OFS)**: l'elemento di misura è un reticolo di fibre di Bragg (FBG, *fiber Bragg grating*) con variazioni periodiche del loro indice di rifrazione. Poiché l'indice di rifrazione dipende dalla temperatura, la riflessione misurata può essere correlata alla temperatura locale. Questa tecnologia è usata sia per monitoraggi invasivi, tramite un arrangiamento ad elica per misurare il profilo di temperatura nel prodotto, sia per misure non invasive, includendo la fibra nel fondo del flacone. Gli OFS sono più sensibili delle termocoppie, caratterizzati da tempi di risposta più brevi e migliori risoluzioni, e sono sterilizzabili. Recentemente sono stati proposti per monitorare il processo di liofilizzazione (Kasper *et al.*, 2013);

- **Temperature remote interrogation system (TEMPRIS)**: si tratta di sistemi *wireless* che permettono di misurare la temperatura e che utilizzano l'energia fornita da un campo elettromagnetico (Schneid e Gieseler, 2008). I TEMPRIS richiedono la presenza di componenti aggiuntivi all'interno del liofilizzatore per garantire che i sensori siano opportunamente irradiati dal campo elettromagnetico. Il principale svantaggio di questa tecnologia è legato alle grosse dimensioni dello strumento, che condizionano non solo il congelamento, ma anche l'essiccamento. Infatti, l'altezza di riempimento nel flacone aumenta notevolmente se il sensore è completamente immerso per misurare la temperatura al fondo del flacone.

Come strumento di misura non invasivo è anche stato proposto un sistema di termocoppie incorporato, mediante *plasma sputtering*, in un sottile film sub-micrometrico che viene fatto aderire alla parete esterna del flacone (Parvis *et al.*, 2012, Grassini *et al.*, 2013, Parvis *et al.*, 2014). Purtroppo, però, questo sistema, così come quello a fibre ottiche (OFS), richiede l'utilizzo di particolari flaconi o speciali ripiani che possono essere incompatibili con i sistemi esistenti.

Gli svantaggi legati all'utilizzo di alcuni degli strumenti precedentemente elencati possono essere superati grazie all'ausilio di altre tecnologie, ad esempio sistemi a batteria con termocoppie ed una radio incorporata operante a 2.4 GHz in modo da assicurare la comunicazione radio ad una distanza di 10-20 m dal ricevitore (Bosca *et al.*, 2013).

Tuttavia, un grosso svantaggio di tutte queste tecnologie, indipendentemente dal fatto che la misura sia o meno invasiva, è il carattere "puntuale" dei valori di temperatura ottenuti. Sarebbe pertanto impossibile risalire alla velocità di avanzamento del fronte di congelamento R e ai gradienti di temperatura nella zona congelata G , per determinare i quali servono i profili di temperatura lungo tutto il prodotto.

In questo contesto, pertanto, l'utilizzo di una termocamera a infrarossi (Hemteborg *et al.*, 2014, Lietta *et al.*, 2019) è di particolare interesse.

La termografia ad infrarossi è una tecnica innovativa che permette di monitorare la temperatura del prodotto senza alcun contatto con il prodotto stesso. Il principio fisico su cui si basa è che ogni corpo è in grado di emettere delle radiazioni elettromagnetiche, la cui intensità è proporzionale alla temperatura del corpo stesso. In questo contesto, è bene ricordare che la radiazione che colpisce un determinato corpo è somma di tre contributi. Una prima frazione viene assorbita, causando una variazione di temperatura del corpo stesso: questo contributo si quantifica tramite l'assorbanza α_g , definita come rapporto tra la radiazione assorbita e quella incidente. Una seconda parte viene riflessa, come descritto dalla riflettanza ρ (rapporto tra la radiazione riflessa e quella incidente). Un'ultima frazione viene infine trasmessa attraverso il corpo, e il rapporto tra la quantità di radiazione trasmessa e quella incidente è noto come trasmittanza τ_g . Un ultimo parametro di grande importanza è l'emissività ε_g , ovvero il rapporto tra la radiazione emessa dal corpo e quella che emetterebbe un corpo nero posto alla stessa temperatura. Il valore di ε_g dipende dal materiale, è funzione di lunghezza d'onda e temperatura, ed è di estrema importanza in quanto influenza l'accuratezza della misura fornita dalla termocamera. Per esempio, un corpo trasparente, caratterizzato da ε_g nulla, non può essere studiato tramite termografia. Pertanto, durante il *tuning* della termocamera è necessario individuare il valore corretto di emissività dell'oggetto monitorato.

Hemteborg (Hemteborg *et al.*, 2014) fu il primo a sfruttare i vantaggi legati all'uso della termografia ad infrarossi (IRT) per monitorare il processo di liofilizzazione. In questo primo lavoro, però, la termocamera venne montata nella parte superiore del liofilizzatore, ed esteriormente allo stesso, consentendo il solo monitoraggio della parte sommitale del prodotto.

In un lavoro più recente (Lietta *et al.*, 2019) la termocamera è stata posta all'interno del liofilizzatore, sopra i ripiani, per studiare l'intero processo di liofilizzazione. L'obiettivo in questo caso era di verificare se vi fosse interferenza tra la termocamera e le dinamiche del processo, studiare l'attendibilità delle misure di temperatura del prodotto e stimare il punto di fine dell'essiccamento primario, valutando inoltre il coefficiente globale di scambio di calore e la resistenza al trasporto di materia.

Un'altra possibile applicazione, descritta in letteratura, per la termografia a infrarossi è quella della liofilizzazione in continuo. In Van Bockstal *et al.* (2018), per esempio, il prodotto viene preventivamente congelato da un flusso di gas a bassissima temperatura mentre è posto all'interno di un flacone in rotazione (*spin freezing*). La formulazione si distribuisce quindi sulle pareti laterali del contenitore e, durante l'essiccamento primario, il fronte di sublimazione si muove in direzione radiale e non longitudinale come nel processo di liofilizzazione classico. In questo caso la termografia costituisce quindi una valida soluzione per monitorare la temperatura del prodotto.

In definitiva, la termocamera a IR consente di ottenere i valori di temperatura in maniera non invasiva, quindi senza compromettere la sterilità del prodotto o perturbarne il comportamento. Inoltre, essa permette di avere, tramite analisi d'immagine, una panoramica completa della distribuzione di temperatura nel *batch* sottoposto a liofilizzazione. Ciò consente quindi di stimare anche il grado di eterogeneità tra flaconi di uno stesso *batch* (Barresi *et al.*, 2010). Per questi motivi, l'utilizzo della termografia a IR è stato selezionato per questo lavoro di Tesi.

1.4 Scopo del lavoro

L'obiettivo in questo lavoro di Tesi, è quello di determinare, tramite l'utilizzo di due tipologie di modelli descritti in seguito, la distribuzione del diametro dei cristalli che si sono formati nella fase di congelamento. Inoltre, attraverso l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione (SEM), verranno analizzati i campioni essiccati in modo da poter ottenere una distribuzione dimensionale sperimentale che verrà confrontata con quella ricavata tramite utilizzo dei due modelli. La conoscenza della dimensione dei cristalli lungo lo spessore di prodotto congelato consente di valutare la resistenza al trasporto di materia R_p . Noto questo valore, risulta possibile stimare la durata della fase di essiccamento e, quindi, la massima temperatura raggiunta dal prodotto. Inoltre, questo permette di ottimizzare il processo senza andare a danneggiare il prodotto solido essiccato, e quindi evitare il collasso della struttura. Infine, a questo punto è possibile convalidare i modelli utilizzati ed essere in grado, analizzando la sola fase di congelamento, di predire ciò che accadrà successivamente nel processo.

2 Metodologie sperimentali e di calcolo

In questo capitolo, dopo una breve descrizione della termocamera impiegata per il monitoraggio del processo, verranno spiegate le metodologie usate per misurare l'emissività del vetro dei flaconi utilizzati per le prove. Questo parametro è di estrema importanza perché condiziona il valore di temperatura misurato dallo strumento. Successivamente verrà descritta la procedura utilizzata per convalidare le misure ottenute tramite la termocamera, e si spiegherà come da queste sia possibile risalire ai valori di R (velocità di avanzamento del fronte di congelamento) e G (gradiente di temperatura nella zona congelata), variabili la cui conoscenza consente di stimarne i valori di diametro dei pori in quello che sarà il prodotto essiccato (D_p) e, da questi, la resistenza al trasferimento di materia (R_p) all'interno del prodotto liofilizzato. Infine, si descriverà l'approccio sperimentale, basato anche su microscopia elettronica a scansione (SEM), e l'utilizzo di un modello matematico per l'essiccamento primario ai fini della convalida dei risultati ottenuti.

2.1 Termocamera

In questo lavoro di Tesi la termocamera è stata usata come sistema di monitoraggio della temperatura del prodotto all'interno del liofilizzatore. Questa è un modello TICEM, costituito da un sistema di ripresa termografica con risoluzione 320x256 pixel che opera nello spettro LW delle onde elettromagnetiche dell'infrarosso, e da un sistema di ripresa operante nel visibile a bassa risoluzione (Figura 2.1).



Figura 2.1: Vista frontale della termocamera, modello TICEM.

Inoltre, è presente un led a luce fredda che permette le misure nel visibile. Il sistema di acquisizione consente di posizionare *tools* di tipo lineare, bidimensionale e puntuale (*spot*) sull'immagine acquisita. I risultati ottenuti con la termocamera sono le immagini termografiche (campo infrarosso) e quelle nel campo visibile, oltre ai valori di temperatura nel tempo degli *spots* considerati (Lietta, 2018). Come si spiegherà nel seguito, la

conoscenza del valore di emissività degli oggetti monitorati dalla termocamera è fondamentale per avere una misura di temperatura affidabile.

2.2 Misura dell'emissività del vetro dei flaconi

Il primo step del lavoro è stato quello di trovare il valore corretto di emissività dei flaconi monitorati per ottenere delle misure di temperature più accurate possibili, dal momento in cui inizia la nucleazione fino alla fine del congelamento.

L'emissività varia con la temperatura. In letteratura si trovano però valori solo per temperature superiori a 0°C, e quindi non utili durante la fase di congelamento.

L'accuratezza della misura della temperatura ottenuta con la termocamera dipende dalla conoscenza di diversi parametri impiegati per correggere l'influenza di radiazioni non direttamente emesse dall'oggetto analizzato (Lietta *et al.*, 2019).

La valutazione dell'emissività dell'oggetto inquadrato e della temperatura apparente riflessa dell'ambiente circostante rappresentano quelli obiettivi di primaria importanza (si veda <https://termocamerafacile.com/>).

L'ambiente circostante emette energia verso l'oggetto che si vuole analizzare. Una volta che la radiazione colpisce il corpo, come spiegato nel capitolo precedente, si possono verificare le tre situazioni seguenti: la radiazione può essere trasmessa, riflessa o assorbita. A sua volta l'oggetto inquadrato emetterà delle radiazioni. Dunque, la parte di radiazione riflessa, assieme a quella emessa realmente dall'oggetto, raggiungono la termocamera, influenzando il valore di temperatura che viene misurato.

Il software presente nella termocamera permette di misurare e caricare automaticamente, durante l'intera durata del processo, il valore di temperatura apparente riflessa (numero che quantifica l'energia proveniente dall'ambiente circostante e che viene riflessa dal corpo analizzato) utilizzando un riflettore puro (carta stagnola), in accordo con la normativa ISO 18434-1 Part 1, Annex A.1 (International standard ISO 18434-1, 2008). In questo modo si riesce ad eliminare, dal segnale che arriva alla termocamera, la parte di radiazione non proveniente dall'oggetto analizzato e, quindi, a misurarne il valore corretto di temperatura.

Per stabilire il corretto valore di emissività si sono invece condotte prove a differenti temperature seguendo la normativa ISO 18434-1 Part 1, Annex A.2, come descritto nel seguito.

I metodi per la valutazione dell'emissività proposti dalla normativa sono due: il *metodo a contatto*, più complesso da applicare perché richiede non solo l'utilizzo di termocoppie molto precise, ma anche tempi molto lunghi, e il *metodo di riferimento*, che è quello usato in questo lavoro di Tesi.

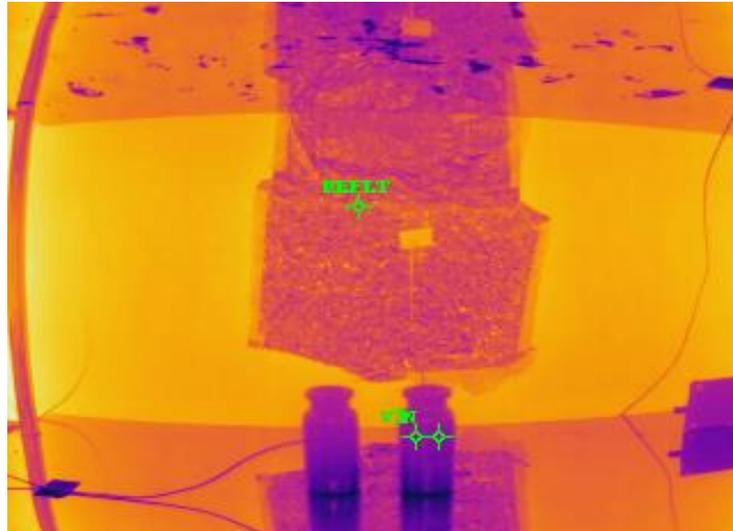
Il calcolo dell'emissività di un materiale con il metodo di riferimento prevede il confronto tra due superfici alla stessa temperatura di cui sia nota l'emissività di almeno una delle due. Il materiale di riferimento utilizzato è il nastro isolante 3M che ha emissività pari a 0.95.

Di seguito la procedura realizzata:

- a. Si sono presi 2 flaconi di capacità pari a 10 ml (10R): in un flacone (oggetto di studio) è stato applicato del nastro isolante su parte della superficie, nell'altro, invece, è stata inserita una termocoppia per effettuare un confronto tra le due misure (Fig. 2.2a);
- b. Si è portato il sistema alla temperatura di interesse, prestando attenzione ad avere una differenza di almeno 20°C rispetto alla temperatura apparente riflessa misurata dal software della termocamera, così da garantire una misura stabile;

- c. Si è inserito uno *spot* sul nastro isolante applicato alla superficie dell'oggetto, molto vicino al materiale di emissività sconosciuta (Fig. 2.2b);
- d. Si è misurata la temperatura reale dell'oggetto ad emissività pari a 0.95;
- e. Si è inserito un altro *spot* sul materiale di cui si desidera calcolare l'emissività, modificandola da 0.95 al valore che permetta di uguagliare la temperatura letta nel punto (Fig. 2.2b).

a)



b)



Figura 2.2: Immagine della termocamera a) con gli *spot* sul flacone e sulla carta stagnola e b) della camera durante la prova per la determinazione della emissività.

Le prove sono state condotte a valori di -30°C , -18°C , 0°C e dopo aver raggiunto lo stato stazionario si è ottenuto per ogni temperatura un valore di emissività mediato su 2 prove effettuate (Tabella 2.1).

Tabella 2.1: Valori di emissività a diverse temperature per le due prove.

T_f (Temperatura fluido refrigerante °C)	Emissività prova 1	Emissività prova 2	media
-30	0.95	0.95	0.95
-18	0.94	0.93	0.935
0	0.91	0.92	0.915

Infine, mediando i risultati ottenuti alle diverse temperature, si è trovato un valore di emissività pari a 0.93.

2.3 Convalida della misura di temperatura della termocamera

Dopo aver ottenuto il valore di emissività si è proceduto col verificare l'accuratezza della misura di temperatura fornita dalla termocamera durante il processo di congelamento. Inoltre, poiché la termocamera misura la temperatura esterna dei flaconi, si è verificato che non vi fossero differenze significative tra il valore di temperatura nella soluzione e quello misurato alla parete dei flaconi.

A tale scopo, sono state inserite delle termocoppie sia nella parete esterna dei flaconi sia all'interno (Fig. 2.3): utilizzando il software della termocamera sono state inoltre inseriti degli *spots* alla stessa altezza della termocoppia, al fine di effettuare un confronto tra i due sistemi di misura.



Figura 2.3: Posizionamento delle termocoppie nei flaconi al fine di convalidare le misure della termocamera.

Come si vede dalla Figura 2.4, le misure fornite dalla termocoppia collocata al fondo della parete esterna del vetro sono molto simili a quelle della termocamera. Inoltre, si nota come anche le misure all'interno del liquido siano molto simili, tranne al raggiungimento di temperature molto basse, a quelle della termocamera; questo è un risultato significativo perché giustifica l'uso della stessa come sistema di monitoraggio del processo.

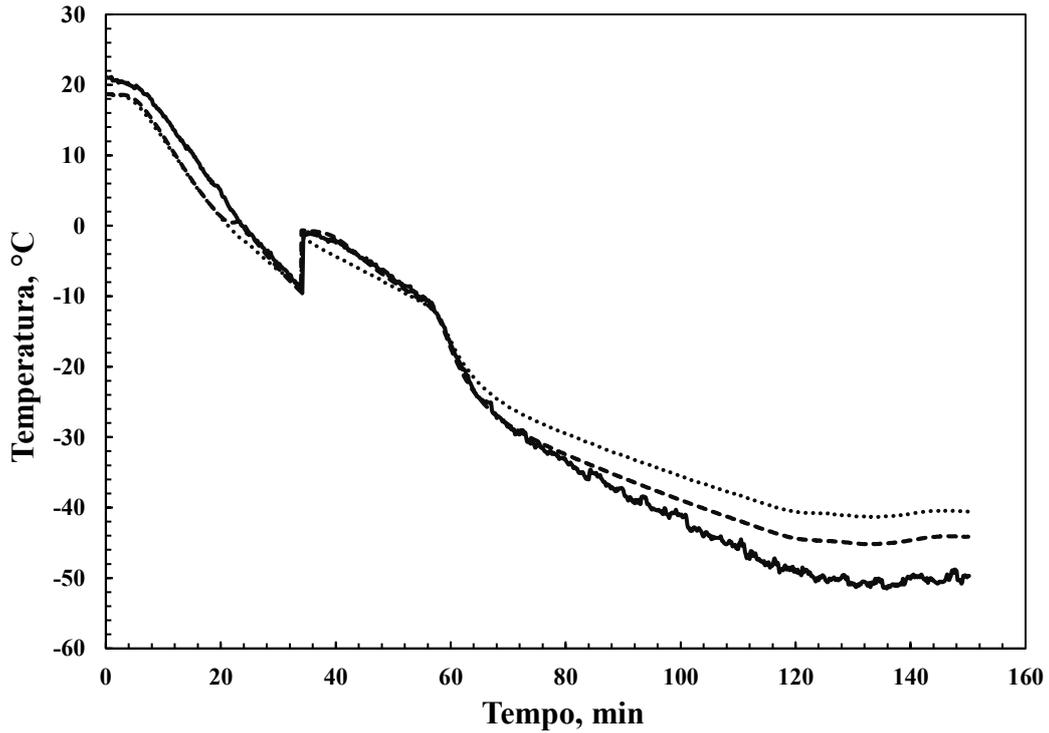


Figura 2.4: Confronto tra le misure delle termocoppie e quelle della termocamera. Curva continua: misura termocamera, Curva a trattini: misura termocoppia interna alla soluzione, Curva a punti: misura termocoppia al fondo della parete esterna del flacone.

Dall'equazione di trasferimento del calore lungo la direzione radiale si è cercato infine di confermare la piccola differenza di temperatura tra vetro e liquido, evidente in Figura 2.4.

Il flusso totale verso la parete del flacone q_{side} è la somma di due contributi: irraggiamento ($q_{side,irr}$) e convezione ($q_{side,conv}$):

$$q_{side} = q_{side,irr} + q_{side,conv} \quad (2.1)$$

Il termine di irraggiamento è a sua volta somma di due contributi, dovuti rispettivamente ai ripiani (fattore di vista $F_{sh,side}$ e temperatura T_{sh}) e alle pareti della camera di essiccamento (fattore di vista $F_{wall,side}$ e temperature T_w). $q_{side,conv}$ è il contributo legato alla convezione naturale con l'aria presente nella camera ed è uguale al prodotto tra un coefficiente di trasferimento di calore h_{side} e una forza spingente:

$$q_{side,conv} = h_{side}(T_{air} - T_g) \quad (2.2)$$

dove T_g è la temperatura del vetro, variabile con l'altezza, e T_{air} la temperatura dell'aria. Il coefficiente di scambio h_{side} , come anche la forza motrice ($T_{air} - T_g$), non sono costanti durante il processo, poiché la temperatura varia e, conseguentemente, cambiano le proprietà (conducibilità, viscosità, densità) che condizionano il valore di h_{side} .

I valori del coefficiente di scambio h_{side} e dei fattori di vista per flaconi appoggiati sono stati precedentemente calcolati (Arsiccio, 2016).

I valori utilizzati in questa Tesi sono:

$$h_{side} = 5 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$$

$$F_{sh,side} = 0.52344$$

$$F_{wall,side} = 0$$

Assumendo che i gradienti assiali siano trascurabili, il flusso q_{side} può essere scritto come,

$$q_{side} = k_g \left. \frac{\partial T_g}{\partial r} \right|_{r=R_g+s_g} = h_{side} (T_{air} - T_g|_{r=R_g+s_g}) + \sigma_b F_{sh,side} (T_{sh}^4 - T_g^4) + \sigma_b F_{wall,side} (T_w^4 - T_{g,out}^4) \quad (2.3)$$

dove k_g e σ_b rappresentano la conducibilità della parete in vetro del flacone e la costante di Stefan-Boltzmann, rispettivamente. R_g corrisponde al raggio interno del flacone, mentre con R_g+s_g viene indicato il raggio esterno, come mostrato in Figura 2.5.

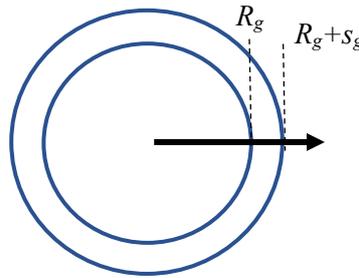


Figura 2.5: Vista dall'alto del flacone in vetro e direzione su cui viene calcolato il flusso.

Se non vi è accumulo, è possibile scrivere anche

$$q_{side} = k_g \left. \frac{\partial T_g}{\partial r} \right|_{r=R_g} \quad (2.4)$$

L'equazione 2.3 deve dunque essere risolta con le seguenti condizioni al contorno:

$$k_g \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T}{\partial r} \right) \right) = 0 \quad \begin{cases} T|_{r=R_g} = T_p \\ T|_{r=R_g+s_g} = T_{g,out} \end{cases} \quad (2.5)$$

Esprimendo poi la forza spingente come media logaritmica si ha:

$$q_{side} = k_g \left. \frac{\partial T_p}{\partial r} \right|_{r=R_g+s_g} = k_g \frac{c_1}{R_g+s_g} = k_g \frac{T_{g,out} - T_p}{(R_g+s_g) \ln\left(\frac{R_g+s_g}{R_g}\right)} \quad (2.6)$$

E combinando le equazioni 2.3 e 2.6:

$$k_g \frac{T_{g,out} - T_p}{(R+s_g) \ln\left(\frac{R_g+s_g}{R_g}\right)} = h_{side}(T_{air} - T_g|_{r=R_g+s_g}) + \sigma_b F_{sh,side}(T_{sh}^4 - T_{g,out}^4) + \sigma_b F_{wall,side}(T_w^4 - T_{g,out}^4) \quad (2.7)$$

Dalla 2.7 è possibile infine esplicitare la temperatura del prodotto T_p :

$$T_p = T_{g,out} - \frac{(R_g+s_g) \ln\left(\frac{R_g+s_g}{R_g}\right)}{k_g} \left(h_{side}(T_{air} - T_g|_{r=R_g+s_g}) + \sigma_b F_{sh,side}(T_{sh}^4 - T_{g,out}^4) + \sigma_b F_{wall,side}(T_w^4 - T_{g,out}^4) \right) \quad (2.8)$$

$$T_p = T_{g,out} - \frac{(R_g+s_g) \ln\left(\frac{R_g+s_g}{R_g}\right)}{k_g} q_{side} \simeq T_{g,out} - 10^{-3} q_{side} \quad (2.9)$$

L'equazione 2.9 fornisce quindi la temperatura alla parete interna del flacone in funzione del calore scambiato e della temperatura esterna del vetro.

Applicando questa equazione, si è ottenuto che la differenza tra interno ed esterno della parete risulta trascurabile (circa pari a 0.15 °C), come confermato dai dati sperimentali.

2.4 Calcolo di R e G dalle immagini della termocamera

Per valutare la distribuzione delle dimensioni dei cristalli ottenuti in seguito al congelamento della soluzione analizzata è necessario conoscere il valore di R e G a valori discreti di tempo e, quindi, di altezza del prodotto.

A questo scopo le immagini ottenute dalla termocamera sono state analizzate da un codice Matlab in grado di calcolare i valori della velocità di avanzamento del fronte di congelamento (R) e di gradiente di temperatura nella zona congelata (G).

Dopo aver ricevuto in input i dati ottenuti con la termocamera e la frequenza di campionamento, all'interno del programma vengono richiamate delle funzioni che hanno lo scopo di correggere, per ogni immagine, effetti di distorsione ottica e di eventuali movimenti della stessa, e di mostrare in tempo reale la posizione del massimo e i profili assiali di temperatura per tutte i flaconi. I profili assiali di temperatura sono ottenuti come media delle temperature di tre linee verticali equidistanti all'interno di ogni flacone, per filtrare il rumore di misura. Dai profili assiali di temperatura è possibile ottenere una stima della temperatura al fondo e sulla superficie superiore del prodotto, nonché del massimo assoluto di temperatura in ogni immagine. Poiché il processo di congelamento è esotermico, il massimo di temperatura corrispondente all'interfaccia tra il prodotto completamente congelato e la soluzione di acqua e ghiaccio in cui l'accrescimento dei cristalli è ancora in corso. Noti questi tre valori di temperatura, è infine possibile ottenere i gradienti di temperatura nella zona congelata (G), e posizione e velocità di avanzamento dell'interfaccia di congelamento (R).

2.5 Stima del diametro dei cristalli e della resistenza al trasporto di materia

Noti la velocità di avanzamento del fronte di congelamento (R) e il gradiente di temperatura (G) lungo l'altezza del prodotto, è possibile stimare la dimensione dei cristalli e, in ultima analisi, la resistenza al trasporto di materia. La dimensione dei cristalli ottenuti durante il congelamento è un parametro di fondamentale importanza, poiché influenza sia la durata dell'essiccamento, sia il massimo di temperatura raggiunto.

Come sottolineato nel primo capitolo, in questo lavoro di Tesi vengono utilizzati due approcci che consentono di determinare il diametro dei pori.

Il primo approccio è di tipo empirico, e permette di risalire al valore del diametro dei cristalli D_p utilizzando una legge di potenza del tipo (1.5):

$$D_p = \alpha R^{-\lambda_1} G^{-\lambda_2} \quad (1.5)$$

dove il parametro α è un coefficiente di proporzionalità che deve essere determinato dal fitting dei dati sperimentali.

Inizialmente, facendo riferimento al lavoro di Bosca (Bosca *et al.*, 2015) per soluzioni al 5% di saccarosio, α è stato assunto pari a $4.59 \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$. Tuttavia, è stato utilizzato lo stesso coefficiente come valore di primo tentativo, anche per quelle al 10% in peso dello stesso zucchero. Invece, per le soluzioni di mannitolo, il valore di α scelto come primo tentativo è stato pari a $1.7 \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$, come riportato da Napoletano nel suo lavoro di Tesi (Napoletano, 2016).

I coefficienti λ_1 e λ_2 , anch'essi dipendenti dal tipo di applicazione, prodotto e condizione di processo, sono stati assunti entrambi pari a 0.5 (Nakagawa *et al.* 2007), come riportato nella Tabella 1.2.

Il secondo approccio è meccanicistico, e fa ricorso all'utilizzo di bilanci di energia e di materia all'interno di un flacone di dimensioni note in cui avviene il congelamento. Il modello, descritto nel primo capitolo, consente di calcolare il diametro dei cristalli per soluzioni diluite, studiate in questo lavoro (si veda par. 2.6), secondo l'equazione (1.7):

$$D_{p,i} = \frac{4\epsilon\gamma b R_i}{(\epsilon\rho_{ice}R_i\Delta H_f - k_s G_i)G_i^{2/3}} \quad (1.7)$$

dove il significato dei vari termini, e la procedura di derivazione, sono spiegati nel primo capitolo. Per questo modello il valore di γb è stato inizialmente assunto pari a $230000 \text{ J K}^{(2/3)} \text{ m}^{(-8/3)}$ e $70000 \text{ J K}^{(2/3)} \text{ m}^{(-8/3)}$ per soluzioni di saccarosio e mannitolo rispettivamente (Arsiccio *et al.*, 2017).

Il diametro dei cristalli condiziona, come detto precedentemente, il flusso di vapore e, quindi, la durata della fase di essiccamento.

Il flusso di vapore nel prodotto secco durante il processo di sublimazione avviene in regime di Knudsen, o regime molecolare, poiché il rapporto tra il cammino libero medio delle molecole e la dimensione caratteristica del sistema fisico preso in esame è > 1 .

Allora il flusso di sublimazione può essere espresso, utilizzando la legge dei gas ideali, come:

$$J_w = \frac{D_e M_w}{RT} \frac{p_{w,i} - p_{w,c}}{L_{dried}} \quad (2.10)$$

dove D_e è la diffusività di Knudsen effettiva, M_w la massa molare dell'acqua, R la costante dei gas, T la temperatura media del prodotto essiccato, L_{dried} lo spessore del prodotto essiccato, $p_{w,i}$ e $p_{w,c}$, la tensione di vapore all'interfaccia di sublimazione e la pressione parziale del vapore in camera (Fissore e Pisano, 2015).

Poiché la temperatura varia solitamente in un intervallo ristretto, è possibile considerare un valore costante e pari a T_i senza compromettere l'accuratezza del risultato finale. Dunque, si ottiene:

$$R_p = \frac{RT_i}{D_e M_w} L_{dried} \quad (2.11a)$$

Inoltre, si può esprimere la diffusività effettiva come:

$$D_e = \frac{r_e}{\tau} K \varepsilon T_i^{0.5} \quad (2.12)$$

dove ε è il grado di vuoto e $\frac{r_e}{\tau}$ è il rapporto tra il raggio effettivo dei pori e la tortuosità (variabile tra 1.4-3), il cui andamento sperimentale risulta essere spesso una funzione lineare rispetto allo spessore L_{dried} (Fissore e Pisano, 2015)

$$\frac{r_e}{\tau} = a_0 + a_1 L_{dried} \quad (2.13)$$

Sostituendo le equazioni 2.12 e 2.13 in 2.11 si ottiene:

$$R_p = \frac{A}{1 + B L_{dried}} L_{dried} \quad (2.14)$$

dove:

$$A = \frac{RT_i^{0.5}}{K \varepsilon M_w a_0}, \quad B = \frac{a_1}{a_0} \quad (2.15)$$

con K pari a $22.9 \text{ m s}^{-1} \text{ K}^{-0.5}$ (Fissore e Pisano, 2015).

Come si può osservare, conoscendo la distribuzione del diametro dei cristalli, e quindi dei pori, lungo lo spessore del prodotto, è possibile risalire ad a_0 e a_1 . Infatti, è sufficiente approssimare con una retta la distribuzione dei diametri ottenuta al variare di L_{dried} . Una

volta noti a_0 e a_1 è poi possibile calcolare la resistenza al trasporto di materia R_p , e quindi, attraverso un modello dell'essiccamento primario, stimare la durata dell'essiccamento primario e la temperatura massima raggiunta.

Tuttavia, in questo lavoro di Tesi, verrà utilizzato un approccio diverso in quanto l'applicazione dell'equazione 2.13 non rispecchia l'andamento reale delle dimensioni dei pori lungo lo spessore di prodotto secco osservata nei casi di studio in esame. A tale scopo, partendo dall'equazione 2.11a e sostituendo la 2.12 si ottiene:

$$R_p = \frac{\tau R T_i^{0.5}}{K \varepsilon r_e M_w} L_{dried} \quad (2.11b)$$

e, nota la distribuzione del diametro dei cristalli di ghiaccio in funzione dello spessore del prodotto, sarà possibile calcolare direttamente la resistenza al trasferimento di materia. Questo andamento verrà approssimato da una curva del tipo 2.14, andando a variare A e B (non più dati da 2.15) in modo da minimizzare lo scarto quadratico medio rispetto ai valori ottenuti da 2.11b. In questo modo si ottengono i valori ottimali di A e B che verranno utilizzati all'interno del modello dell'essiccamento primario.

2.6 Design degli esperimenti

Prima di andare a discutere i risultati ottenuti in questo paragrafo vengono elencate le prove effettuate, con le rispettive condizioni operative.

L'apparecchiatura usata per le prove sperimentali è un liofilizzatore LyoBeta25 (Telstar). La camera interna ha una capacità di 0.2 m^3 ed è connessa ad un condensatore da un condotto di diametro pari a 0.1 m in cui è presente una valvola a farfalla che si apre durante l'essiccamento. Nell'apparecchiatura sono presenti tre sensori di pressione: uno di tipo termocoduttivo (Pirani PGS-101-S) e gli altri due di tipo capacitivo (MKS Type 626A Baratron), collocati rispettivamente nella camera e nel condensatore. Il monitoraggio della temperatura è reso possibile dalla presenza di termocoppie collegate ad un sistema di acquisizione dati. I ripiani all'interno della camera sono mobili, quindi la loro altezza può essere variata grazie alla presenza di un circuito pneumatico ad aria compressa. All'interno dei ripiani (e anche nel condensatore) circola un fluido refrigerante/riscaldante la cui temperatura viene regolata da un sistema di controllo.

Di seguito vengono mostrate le foto del liofilizzatore (Fig. 2.6) e della camera interna vista frontalmente (Fig. 2.7).



Figura 2.6 Liofilizzatore LyoBeta25 (Telstar)



Figura 2.7 Camera interna del liofilizzatore vista frontalmente

Ricordando che lo scopo del lavoro è la determinazione del diametro dei cristalli di ghiaccio, e quindi della resistenza al trasporto di materia, sono state effettuate sia prove di solo congelamento, sia prove complete (congelamento ed essiccamento). Queste ultime sono infatti fondamentali per la determinazione della durata dell'essiccamento primario e della temperatura massima raggiunta, nonché per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei campioni essiccati, che permettono un confronto qualitativo con i profili ottenuti dall'applicazione del modello empirico e meccanicistico.

Di seguito viene riportata una Tabella (2.4) con il numero di prove effettuate e le rispettive condizioni operative.

Le prove 1-9 e quelle 12-14, sono state utilizzate per l'applicazione del modello sperimentale e di quello meccanicistico, mentre le prove 10-11 per il saccarosio e 15 per il mannitolo, per la convalida dei suddetti modelli attraverso l'uso di un modello per l'essiccamento primario.

Tabella 2.4: Elenco delle prove effettuate e delle condizioni operative.

N° prova	Temperatura fluido [°C]	Pressione [Pa]	Durata [h]	prodotto	% in peso	Numero flaconi
1	-50		2.5	Saccarosio	5	4
2	-50		2.5	Saccarosio	5	4
3	-50		2.5	Saccarosio	5	4
4	-50		2.5	Saccarosio	5	4
5	-50		2.5	Saccarosio	5	4
6	-50		2.5	Saccarosio	10	4
7	-50		2.5	Saccarosio	10	4
8	-50		2.5	Saccarosio	10	4
9	-50		2.5	Saccarosio	10	4
10	-50 (Congelamento)		5	Saccarosio	5	30
	-20 (Primario)	10	43			
11	-50 (Congelamento)		5	Saccarosio	10	30
	-20 (Primario)	10	87			
12	-45		2.5	Mannitolo	5	4
13	-45		2.5	Mannitolo	5	4
14	-45		2.5	Mannitolo	5	4
15	-45 (Congelamento)		5	Mannitolo	5	30
	-10 (Primario)	10	40			

2.7 Convalida dell'approccio utilizzato

La distribuzione della dimensione dei cristalli ottenuta tramite l'applicazione dei modelli empirico e meccanicistico verrà confrontata con il diametro dei pori osservato al microscopio elettronico a scansione.

Dal valore del diametro dei cristalli si risalirà, tramite l'equazione 2.11b, all'andamento della resistenza al trasporto di materia R_p in funzione dello spessore di prodotto secco L_{dried} . Questo andamento verrà approssimato, andando alla ricerca dei coefficienti A e B ottimali, dalla funzione espressa dall'equazione 2.14. Quindi, la resistenza al trasporto di materia R_p verrà utilizzata all'interno di un modello matematico per l'essiccamento primario al fine di stimare la durata del processo e la temperatura massima raggiunta dal prodotto secco.

A questo scopo, i coefficienti A e B calcolati in modo da minimizzare lo scarto quadratico medio rispetto ai valori ottenuti da 2.11b, verranno inseriti all'interno di un codice Matlab per valutare R_p . Il programma calcola la temperatura all'interfaccia di sublimazione (T_i) e risolve un sistema di equazioni differenziali che consente di valutare l'andamento di L_{dried} nel tempo (2.16) e di risolvere il bilancio termico all'interfaccia (2.17), calcolando la temperatura al fondo del flacone (T):

$$\frac{dL_{dried}}{dt} = \frac{1}{\rho_{frozen} - \rho_{dried}} J_w = - \frac{dL_{frozen}}{dt} \quad (2.16)$$

$$\Delta H_s \frac{p_{w,i} - p_{w,c}}{R_p} = \frac{T_{fluid} - T_i}{\frac{1}{K_v} + \frac{L_{frozen}}{k_{frozen}}} \quad (2.17)$$

dove L_{frozen} è lo spessore del prodotto congelato con conducibilità termica k_{frozen} , T_{fluid} la temperatura del fluido riscaldante, K_v il coefficiente globale di scambio termico tra il fluido riscaldante e il prodotto al fondo del flacone e ΔH_s l'entalpia di sublimazione.

Risolvendo i bilanci (2.16) e (2.17) sarà possibile risalire alla durata dell'essiccamento primario, e alla temperatura massima raggiunta; questi valori verranno quindi confrontati con quelli osservati sperimentalmente nelle prove 10 e 11 in Tabella 2.4, per convalidare l'approccio utilizzato.

K_v da inserire all'interno del programma e calcolato dalle prove 10 e 11 (per il saccarosio) e 15 (per il mannitolo), viene stimato dalla seguente equazione:

$$m_w \Delta H_s = K_v A_v \Delta T_m t_{drying} \quad (2.18)$$

dove m_w è la massa di acqua presente all'interno di un flacone di area A_v , ΔT_m è la differenza di temperatura media tra quella del fluido e quella del prodotto calcolata dalle misure fornite della termocoppia posta all'interno della soluzione e t_{drying} è il tempo di essiccamento che verrà valutato sperimentalmente, individuando il punto di flesso nella curva che mostra la variazione nel tempo del rapporto tra la pressione misurata dal sensore Pirani e quella del sensore Baratron (Patel *et al.*, 2010).

Come si può notare, il monitoraggio del congelamento è fondamentale perché permette di predire la durata dell'essiccamento e il massimo di temperatura raggiunto dal prodotto, utili per evitare il collasso della struttura che si verifica quando la temperatura è più alta della temperatura transizione vetrosa (per solidi amorfi) o del punto eutettico (per solidi cristallini). Infatti, mentre K_v , come visto dall'equazione 2.18, si stima dalle curve ottenute

sperimentalmente, R_p è determinato dal processo di congelamento. Quindi monitorare il congelamento permette di avere un'indicazione su ciò che può accadere in seguito e di osservare l'effetto legato, per esempio, alla variazione delle condizioni operative, ovvero la pressione in camera e la temperatura del fluido.

3 Risultati

Lo scopo del lavoro, come detto precedentemente, è quello di determinare la resistenza al trasporto di materia, nota la distribuzione della dimensione dei cristalli all'interno dei flaconi, in modo da predire cosa può succedere nelle fasi successive al congelamento.

3.1 Verifica della ripetibilità delle misure effettuate nelle varie prove

Ogni prova di congelamento relativa ad una specifica formulazione è stata condotta alle medesime condizioni operative, come mostrato in Tabella 2.4, ad eccezione delle prove condotte col mannitolo. Dunque, il primo obiettivo è stato verificare la ripetibilità della misura, ovvero osservare, per le temperature misurate nelle varie prove, se veniva ad essere ottenuto lo stesso andamento; se questo è verificato, allora le prove possono essere ritenute equivalenti, in quanto lo scambio termico è il medesimo in ogni prova.

La ripetibilità delle misure per ogni prova è stata confermata sperimentalmente, come si può notare, per esempio, nei grafici sottostanti relativi alla formulazione contenente il 5% di saccarosio. In queste Figure viene mostrata la variazione di temperatura nel tempo per aria (Fig. 3.2), pareti della camera (Fig. 3.1 e 3.3) e ripiani della camera (Fig. 3.4 e 3.5) per la prova 1 (curva rossa), 2 (curva a tratteggio nera), 3 (curva blu), 4 (curva nera continua) e 5 (curva verde) di Tabella 2.4.

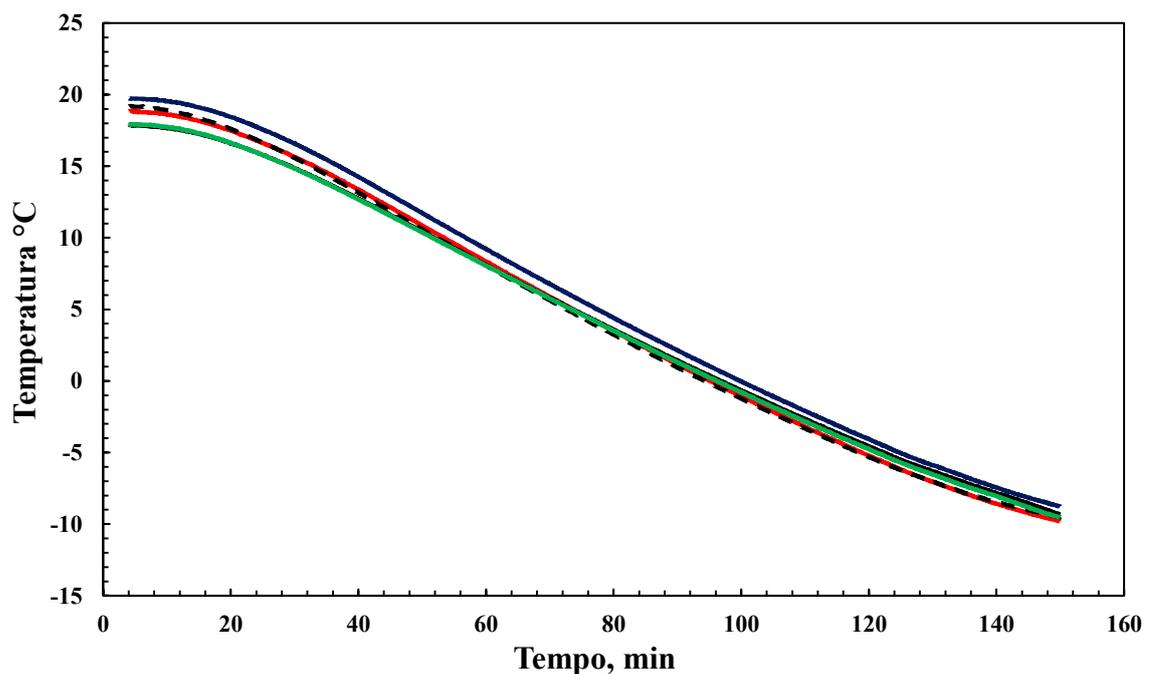


Figura 3.1: Temperatura parete lato sinistro della camera vs tempo

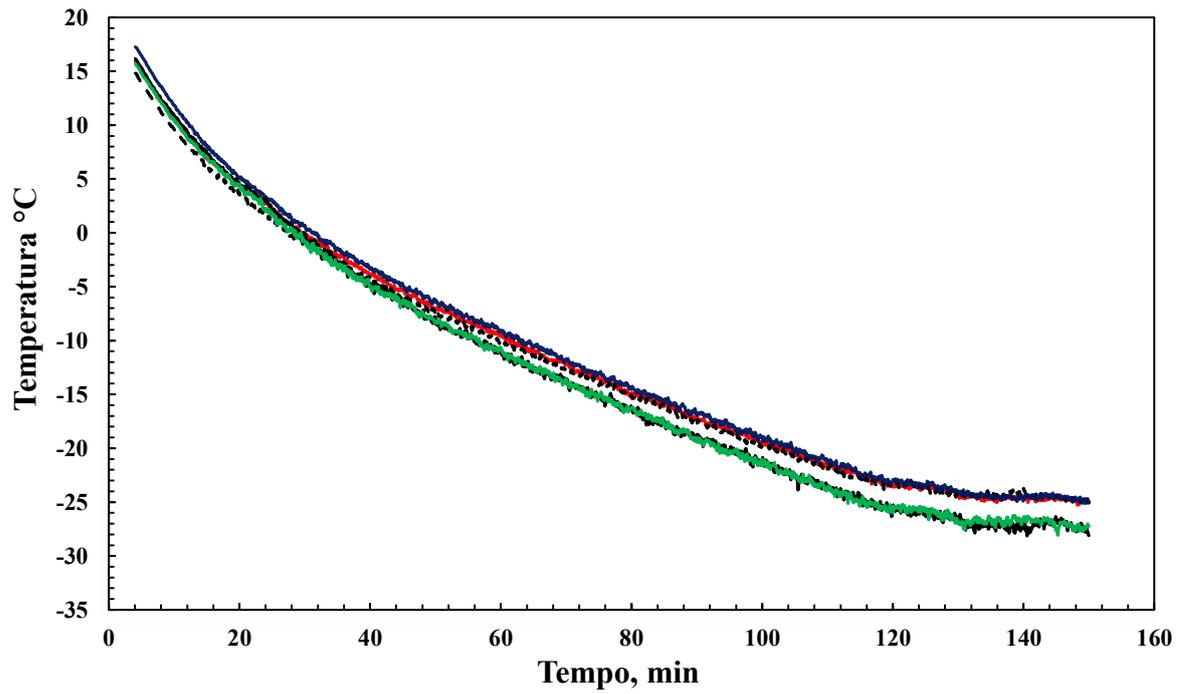


Figura 3.2: Temperatura aria vs tempo.

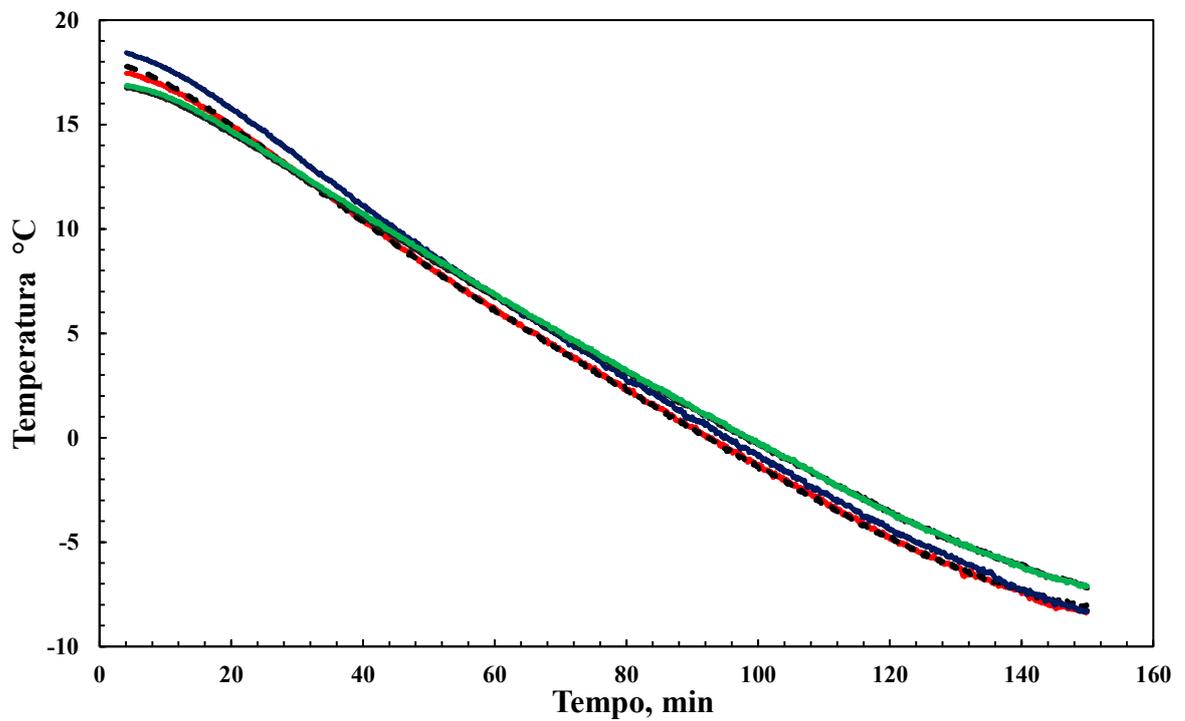


Figura 3.3: Temperatura parete lato destro della camera vs tempo.

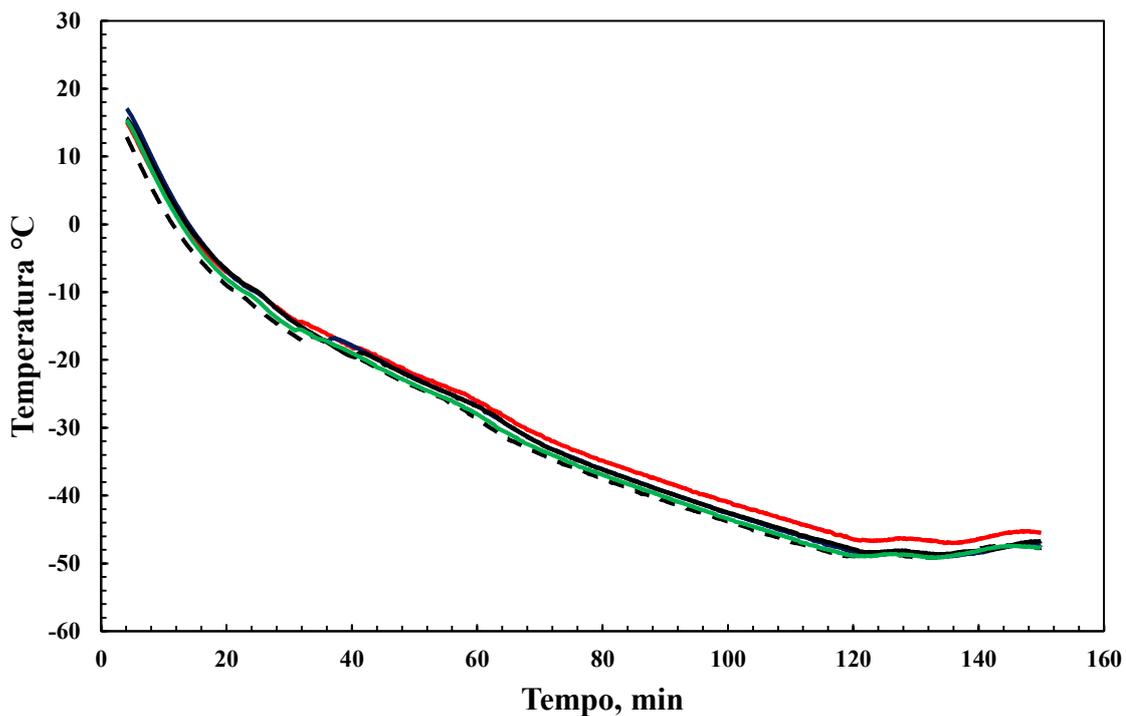


Figura 3.4: Temperatura ripiano inferiore vs tempo.

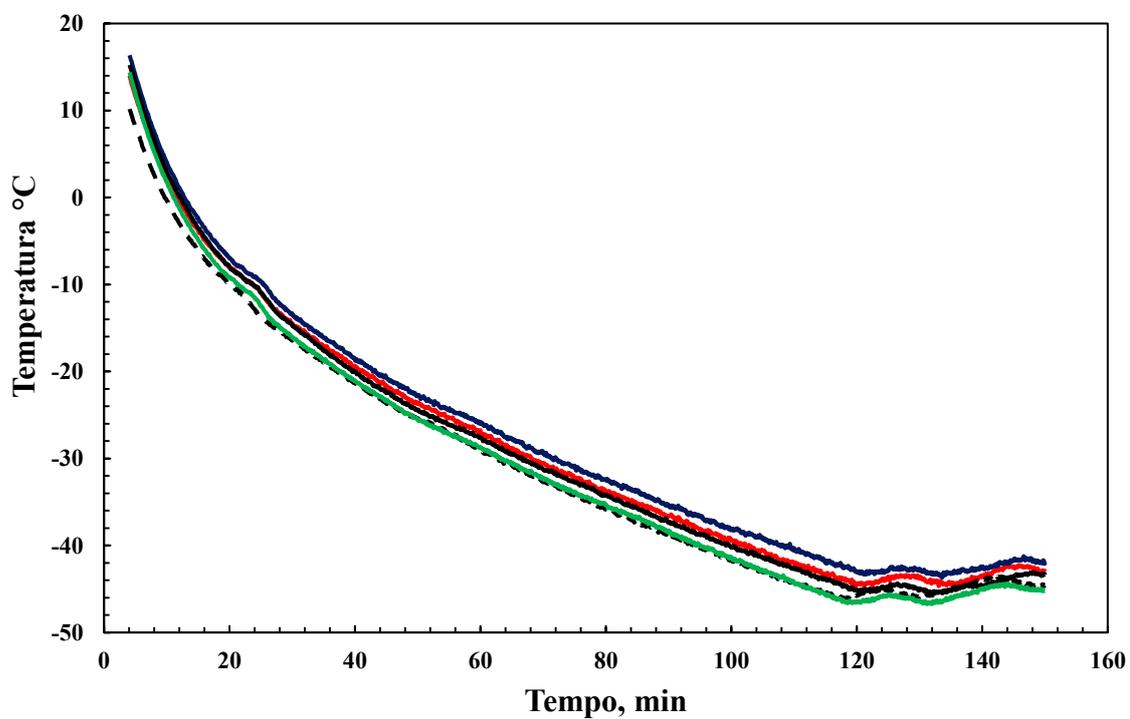


Figura 3.5: Temperatura ripiano superiore vs tempo.

Una volta verificata la trascurabile differenza tra le misure effettuate nelle varie prove, il passaggio successivo, come verrà spiegato dettagliatamente nel paragrafo che segue, sarà quello di valutare la dimensione dei cristalli di ghiaccio analizzando sia le immagini fornite

dalla termocamera sia quelle ottenute tramite microscopio elettronico a scansione per convalidare le stime ottenute a partire dalle misure di temperatura.

3.2 Valutazione di D_p ottenuto per le diverse formulazioni.

In questo paragrafo, inizialmente, l'attenzione verrà focalizzata sulle prove effettuate con una formulazione a base di saccarosio avente un contenuto di solido pari al 5%. Si spiegherà e si illustrerà in dettaglio la procedura utilizzata per stimare, a partire dalle misure di R e G , ottenute tramite termografia, la distribuzione del diametro dei cristalli di ghiaccio, e quindi la resistenza al trasporto di materia. Il confronto tra i risultati derivanti dall'applicazione dei modelli utilizzati e quelli ottenuti tramite analisi SEM dei prodotti liofilizzati, sarà oggetto di discussione di questo paragrafo. La loro utilità, e quindi la loro applicazione dettagliata, sarà trattata nei paragrafi successivi, in cui verranno messi a confronto temperature massime e tempi di essiccazione sperimentali con quelli ottenuti tramite il modello matematico del processo.

Simili risultati verranno presentati più in breve per le altre formulazioni investigate in questo lavoro di Tesi (formulazioni contenenti il 10% in peso di saccarosio e il 5% in peso di mannitolo).

Tramite l'utilizzo del programma Matlab descritto nel paragrafo 2.4 sono stati estratti i valori di R e G ottenuti nelle prove di congelamento 1-5 in Tabella 2.4. Dalla conoscenza di questi ultimi, utilizzando le equazioni 1.5 e 1.7, è stato possibile risalire ai valori di diametro dei cristalli D_p in funzione dell'altezza del prodotto L_{frozen} per ognuno dei 4 flaconi monitorati in ciascuna prova (Fig. 3.6), e numerati in ordine crescente da destra verso sinistra osservando l'immagine sottostante.

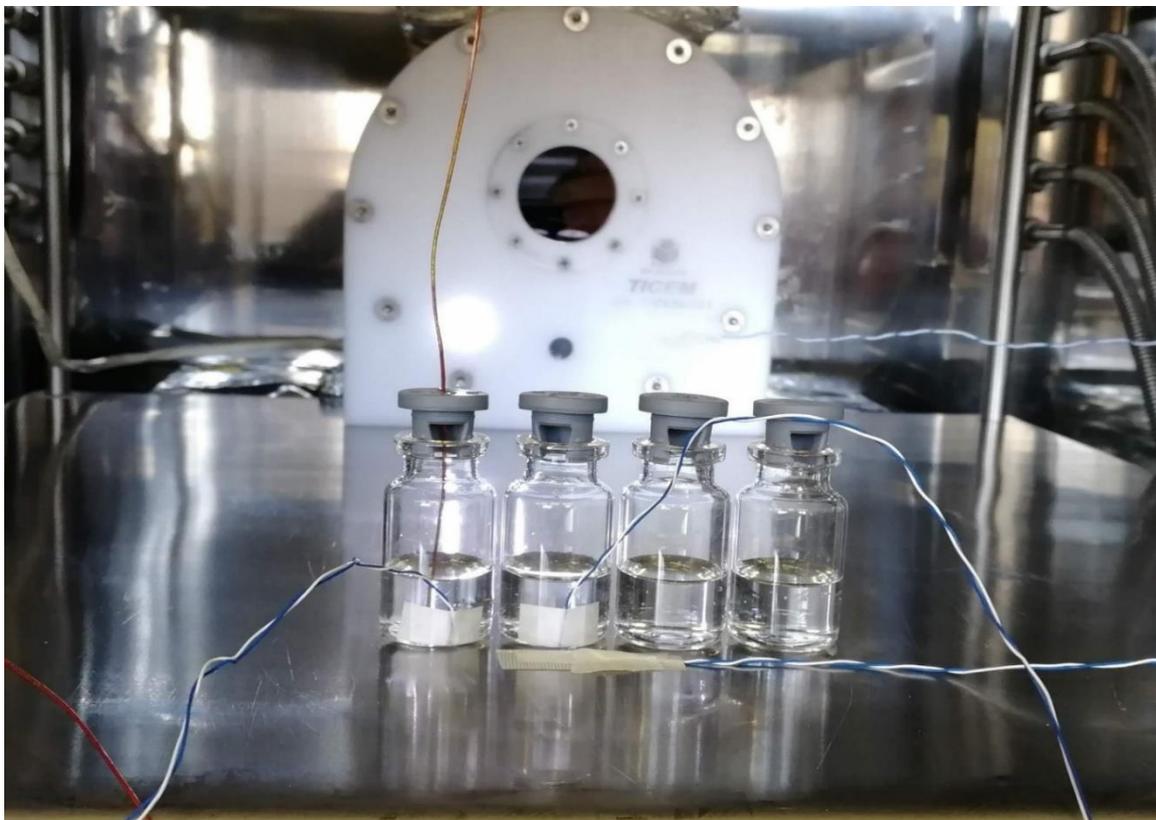


Figura 3.6: Flaconi contenenti soluzione al 5% di saccarosio.

Nelle Figure 3.7-3.11 si riportano i risultati ottenuti tramite applicazione della formula empirica 1.5 per i 4 flaconi analizzati (curva nera per il primo flacone, rossa per il secondo, blu per il terzo e verde per il 4) e per le 5 prove. I profili sono stati ottenuti, come sottolineato nel capitolo 2, con un valore di α pari a $4.59 \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$ (Bosca *et al.*, 2015).

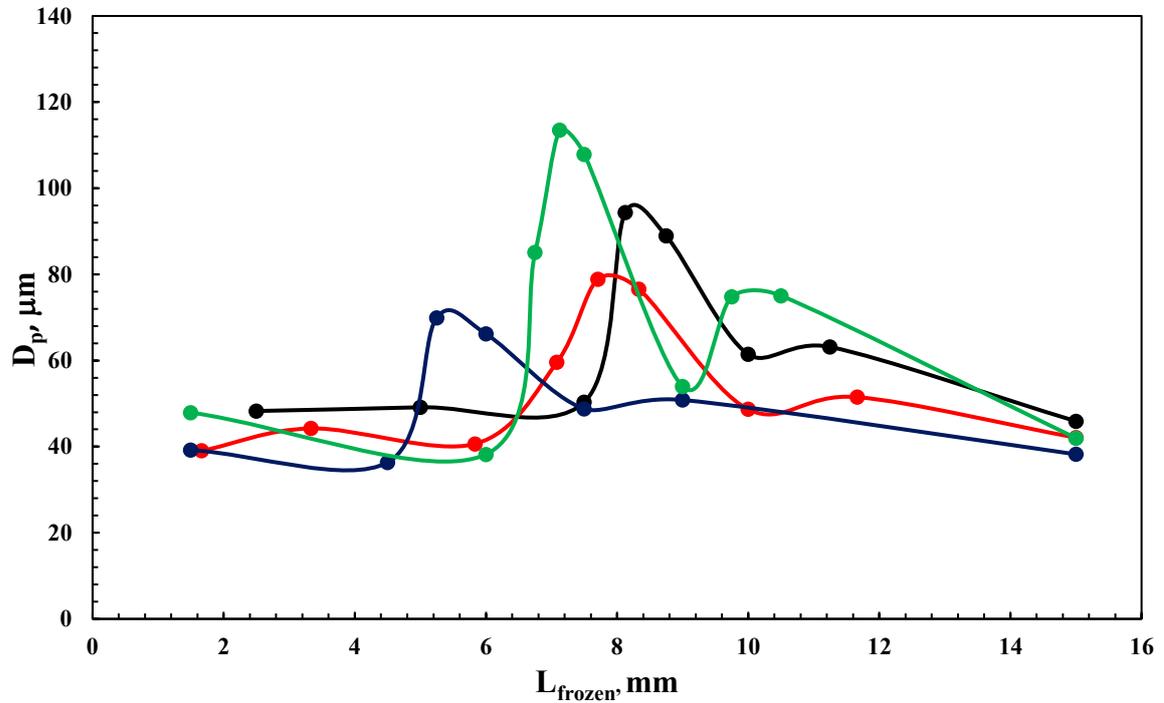


Figura 3.7: Diametro dei cristalli D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per la prova 1.

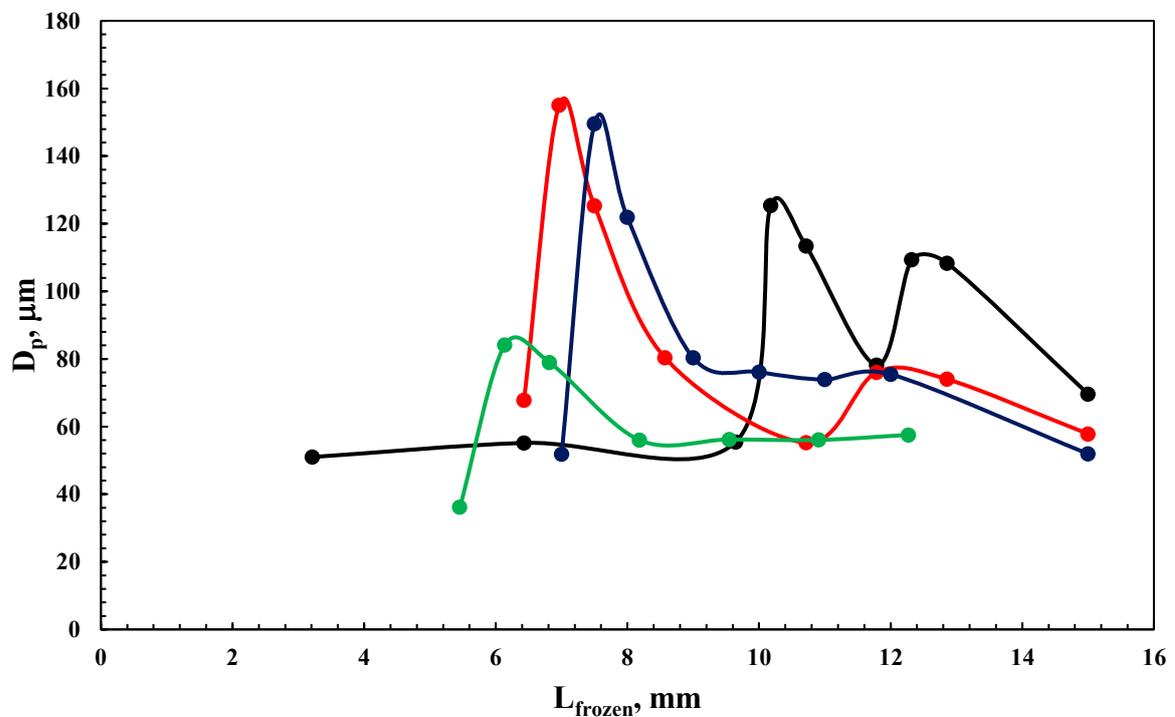


Figura 3.8: Diametro dei cristalli D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per la prova 2.

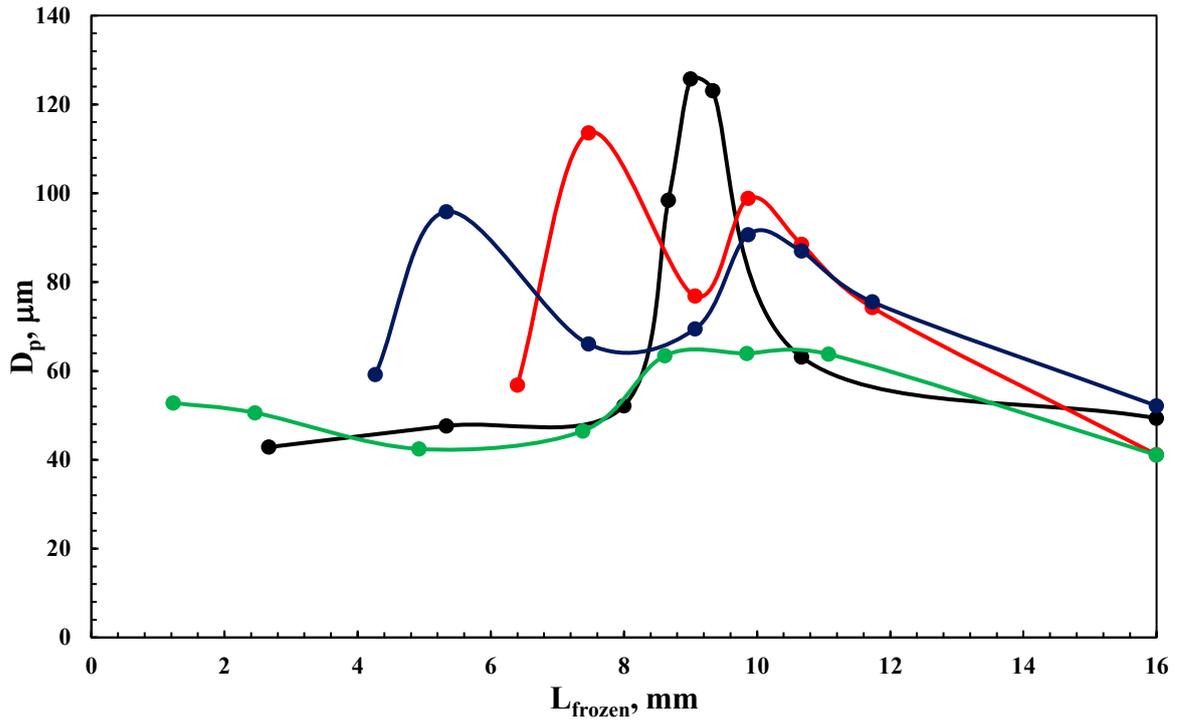


Figura 3.9: Diametro dei cristalli D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per la prova 3.

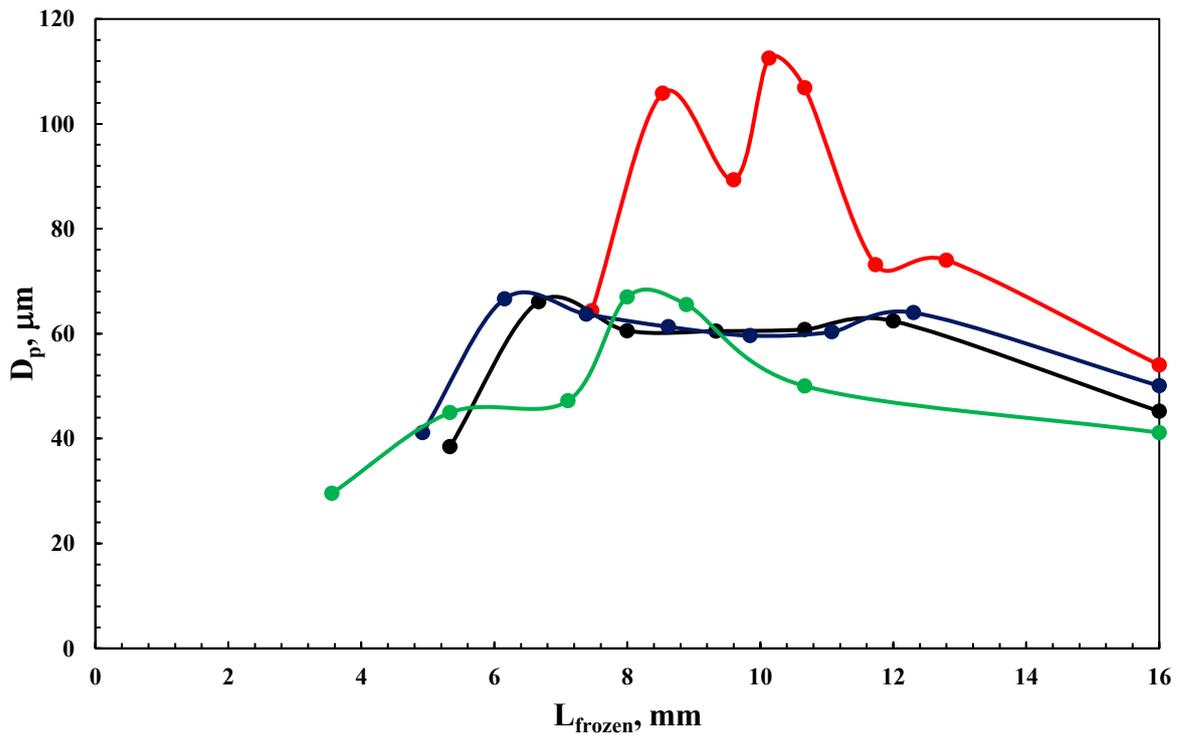


Figura 3.10: Diametro dei cristalli D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per la prova 4.

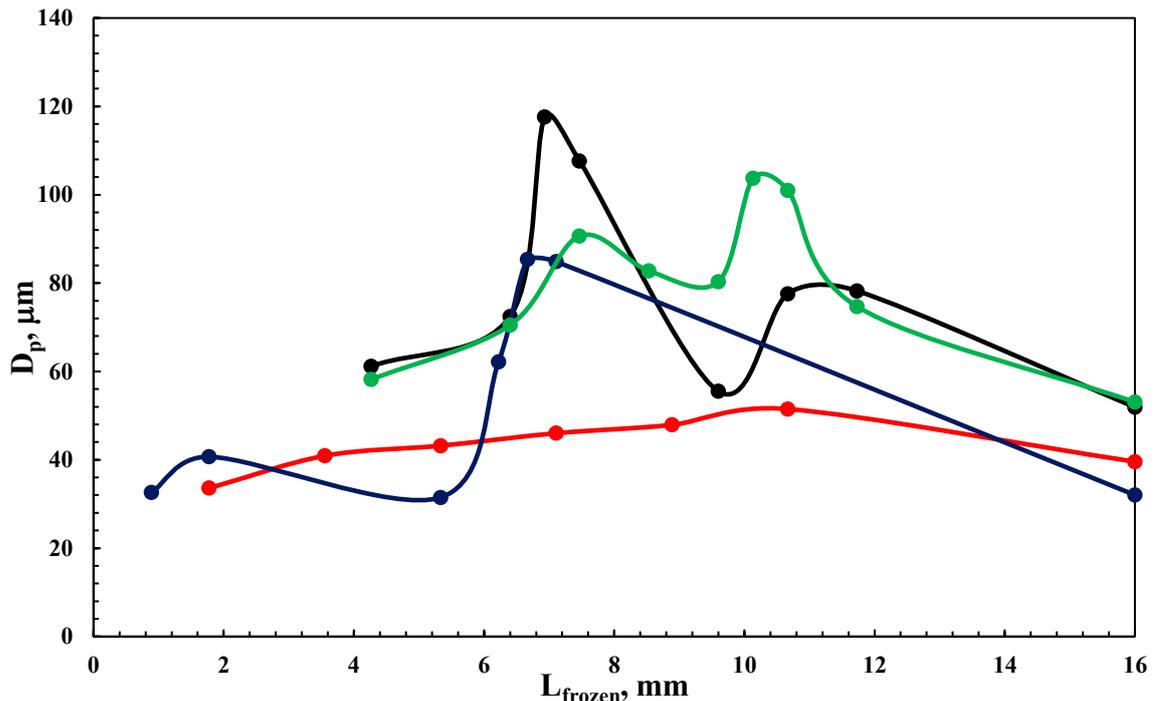


Figura 3.11: Diametro dei cristalli D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per la prova 5.

Gli scostamenti tra i profili riportati nelle Figure 3.7-3.11 potrebbero essere legati ad imprecisioni del sistema di misura, oltre che alla distribuzione statistica delle dimensioni dei pori. Il tempo di campionamento della termocamera, pari a 10 secondi, rende inoltre complesso il monitoraggio di fenomeni a dinamica rapida, quale nucleazione e congelamento. Inoltre, la presenza di fluttuazioni termiche nelle immagini acquisite rende difficile l'utilizzo di tutte le immagini al fine della determinazione di R e G . Analizzando immagini troppo vicine, si rischia infatti di considerare come fenomeni statisticamente rilevanti quelli che sono invece dei rumori nella misura. Per evitare ciò, durante la fase di congelamento solo un'immagine ogni 15 è stata considerata ai fini dell'estrazione dei parametri di interesse. Ciò dovrebbe garantire che i fenomeni osservati siano legati veramente al processo di congelamento e non a fluttuazioni termiche locali.

Altre fonti di imprecisione sono invece insite nel processo di congelamento. Il fronte di crescita dei cristalli non è infatti perfettamente piatto, e ciò ne complica il rilevamento secondo tecniche termografiche. Si è infatti notato che la temperatura misurata in punti posti verso la parete laterale del flacone mostra significative differenze rispetto a quella rilevata nella parte frontale. Per non incorrere in effetti di bordo, o di distorsione ottica, si è perciò cercato di evitare di utilizzare i valori di temperatura misurati nelle zone periferiche del flacone.

Inoltre, come si è spiegato nel paragrafo 2.4, la posizione del fronte di congelamento è stata monitorata ricercando il massimo di temperatura all'interno del prodotto. Ciò è possibile perché il processo di formazione dei cristalli di ghiaccio è esotermico. Tuttavia, mentre i gradienti di temperatura nella zona congelata sono rilevanti, e quindi facilmente distinguibili, quelli presenti nella fase liquida sono di piccola entità e rischiano di confondersi con l'errore di misura legato alla precisione dello strumento. Questo complica la ricerca del massimo, e spesso porta all'errata individuazione di picchi locali nella zona liquida.

Tuttavia, come si può osservare, a meno di fluttuazioni statistiche ed eterogeneità, intrinseche al processo di liofilizzazione, le curve di D_p vs L_{frozen} sono relativamente simili per tutti i flaconi in tutte le prove effettuate. È infatti possibile notare come in ogni caso il diametro dei cristalli abbia un andamento pseudo-parabolico in funzione dell'altezza, con un massimo localizzato approssimativamente al centro del flacone. Sul fondo e nella zona sommitale i cristalli di ghiaccio presentano una dimensione ridotta, a seguito di fenomeni di crioconcentrazione e gradienti di temperatura localizzati (dovuti rispettivamente al contatto col ripiano e con l'aria nello spazio di testa).

Per ottenere informazioni rilevanti alla fine della progettazione di un ciclo di liofilizzazione, è necessario trasformare i valori di D_p così ottenuti in un profilo di resistenza al trasferimento di materia da utilizzare poi all'interno di un modello dell'essiccamento primario. Condizioni operative simili dovrebbero risultare in analoghi tempi di essiccamento e analoghi profili termici. Di conseguenza, a meno di scostamenti statistici, le differenti morfologie del prodotto osservate nei flaconi congelati nelle prove 1-5 dovrebbero ricondursi ad uno stesso andamento di resistenza al trasporto di materia R_p .

Per ottenere questo andamento è stato innanzitutto ottenuto un diametro medio in funzione dello spessore dello strato essiccato a partire dai risultati ottenuti nelle varie prove. A questo scopo l'altezza L_{frozen} del prodotto è stata discretizzata in una serie di n intervalli $j=1,2,\dots,n$, di uguale estensione $\Delta z = 2$ mm. Si è quindi calcolata la media, e la deviazione standard, dei valori di D_p per ogni flacone e per ciascuna delle 5 prove all'interno di ogni intervallo. Ciò ha portato all'ottenimento di un'unica curva D_p vs L_{frozen} riportata in Figura 3.12. Tale Figura è stata ottenuta dalla media dei valori di diametro calcolati con l'equazione 1.5, e riportati nelle Figure 3.7-3.11.

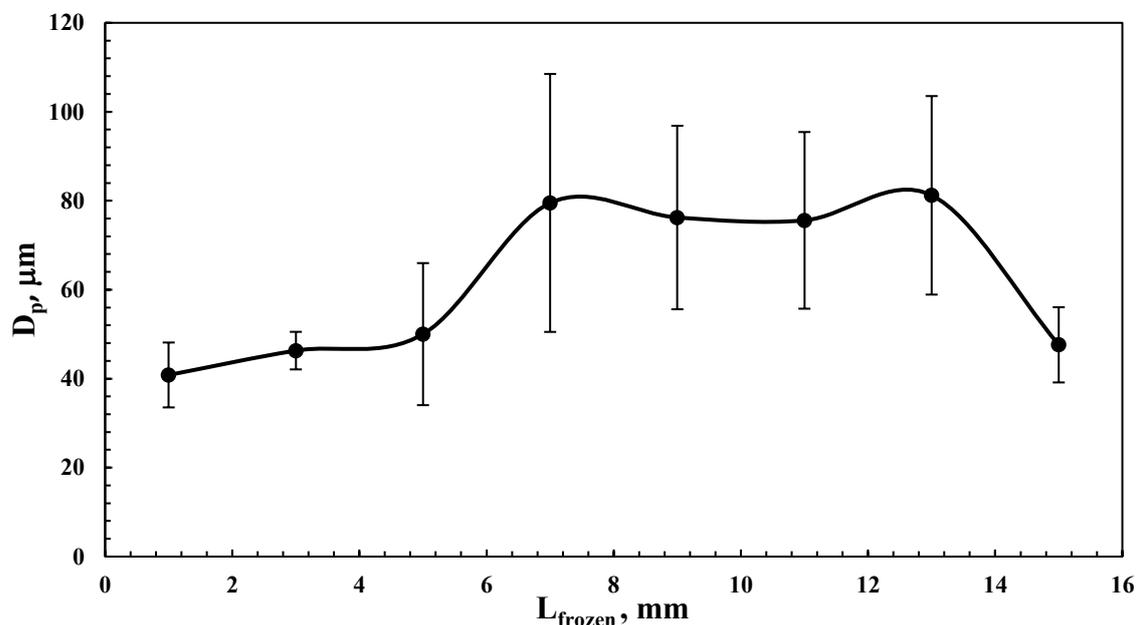


Figura 3.12: Diametro medio D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} con relative barre di errore il cui limite inferiore (superiore) è pari alla deviazione standard, per soluzioni al 5% in peso di saccarosio.

Una procedura simile è stata effettuata nel caso dell'equazione 1.7 (modello meccanicistico). Il profilo mostrato in Figura 3.13 (curva rossa) è stato ottenuto utilizzando un valore di γb inizialmente pari a $230000 \text{ J K}^{(2/3)} \text{ m}^{(-8/3)}$ (Arsiccio *et al.*, 2017).

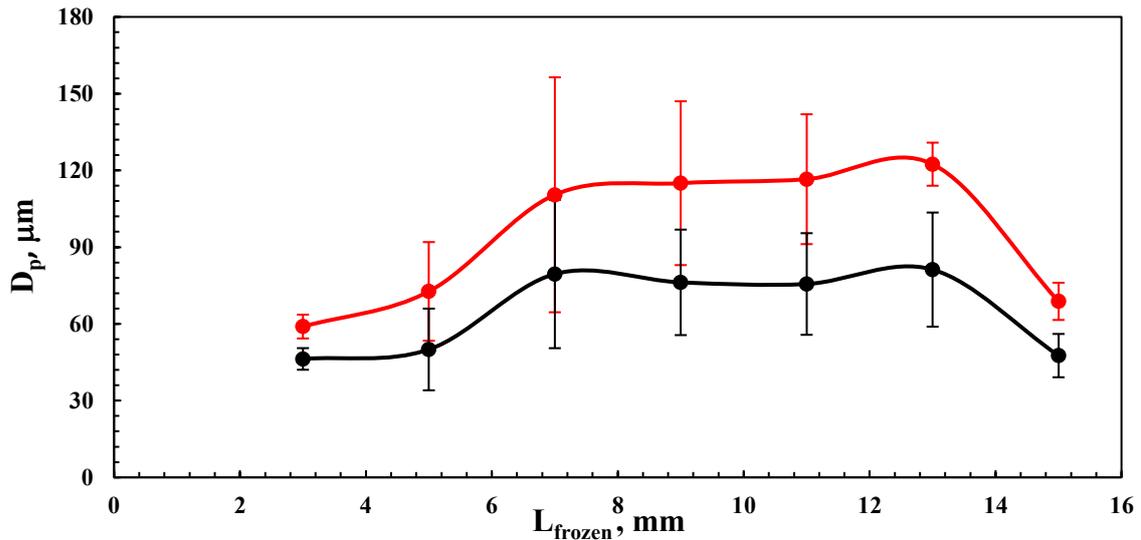


Figura 3.13: Diametro medio D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} secondo 1.7 (curva rossa) e 1.5 (curva nera) con relative barre di errore, il cui limite inferiore (superiore) è pari alla deviazione standard, per soluzioni al 5% in peso di saccarosio.

Come si può osservare, l'effettuazione di questa media ha portato alla rimozione di diversi picchi osservati nei singoli profili (Figure 3.7-3.11), probabilmente legati ad errori nelle misure sperimentali di R e G .

Analogamente, i suddetti modelli sono stati utilizzati per le prove al 10% di saccarosio e al 5% di mannitolo in modo da poter fare un confronto tra formulazioni diverse.

Gli andamenti del diametro medio dei cristalli in funzione dello spessore congelato, relativo alle prove 6-9 (10% di saccarosio) e 12-14 (5% di mannitolo) di Tabella 2.4, sono mostrati rispettivamente nelle Figure 3.14 e 3.15. I valori dei parametri empirici α e γb , utilizzati per ottenere i profili di Fig. 3.14, sono stati assunti uguali a quelli delle soluzioni al 5% di saccarosio, ovvero, rispettivamente, $4.59 \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$ e $230000 \text{ J K}^{(2/3)} \text{ m}^{(-8/3)}$, non essendo disponibili altri valori in letteratura. L'ipotesi della costanza dei parametri empirici al variare della concentrazione (per soluzioni diluite) verrà verificata successivamente.

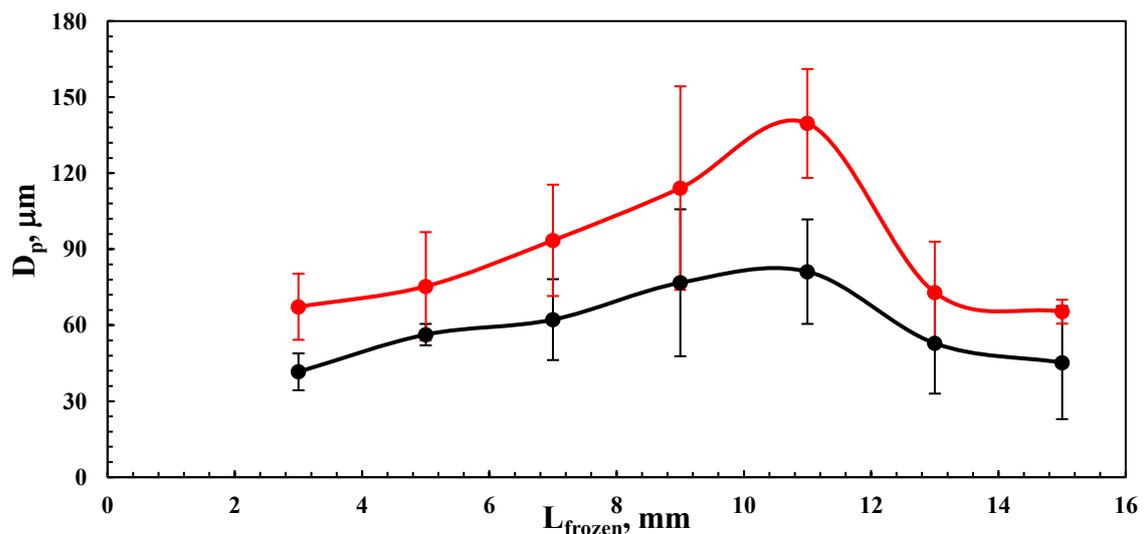


Figura 3.14: Diametro medio D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} , per soluzioni al 10% in peso di saccarosio, secondo modello sperimentale (curva nera) e meccanicistico (curva rossa) con relative barre di errore, il cui limite inferiore (superiore) è pari alla deviazione standard.

I profili derivanti dall'applicazione del modello empirico e di quello meccanicistico per soluzioni di mannitolo al 5%, riportati nella Figura 3.15, sono stati ottenuti rispettivamente con valori di α pari a $1.7 \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$ (Napoletano, 2016) e $70000 \text{ J K}^{(2/3)} \text{m}^{(-8/3)}$ (Arsiccio *et al.*, 2017).

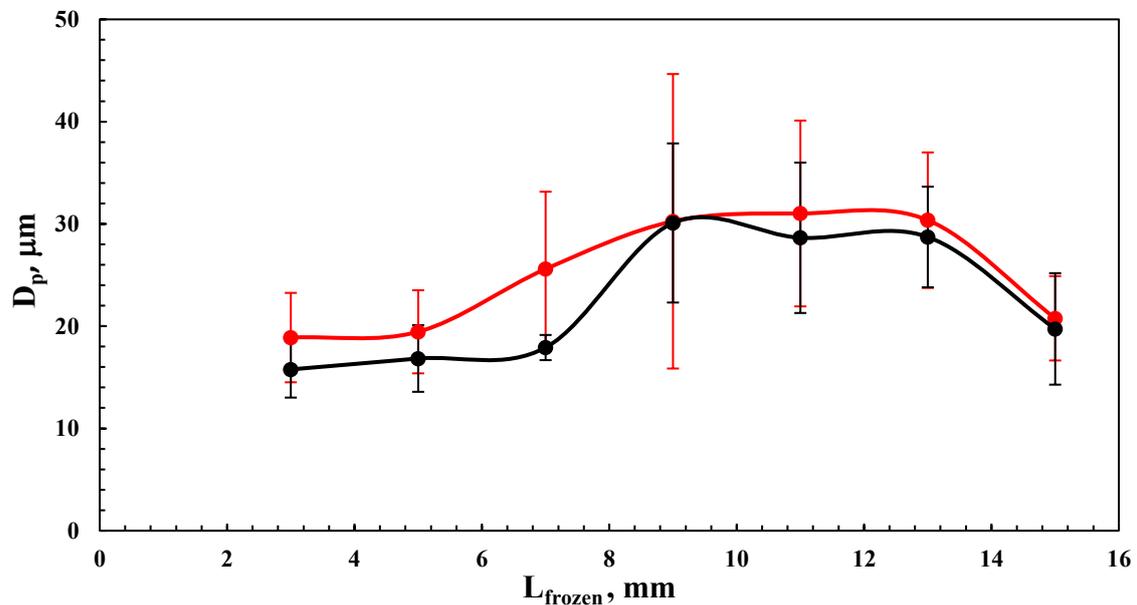


Figura 3.15: Diametro medio D_p vs spessore prodotto congelato L_{frozen} per soluzioni al 5% di mannitolo secondo modello sperimentale (curva nera) e meccanicistico (curva rossa) con relative barre di errore, il cui limite inferiore (superiore) è pari alla deviazione standard.

Inoltre, si può notare che entrambi i modelli, da un punto di vista qualitativo, mostrano un andamento simile, ma con valori di diametri differenti a parità di altezza di prodotto considerata. Questi profili, ottenuti con i parametri presenti in letteratura, sono stati confrontati con quelli ricavati in seguito all'analisi delle immagini SEM.

A questo scopo, i prodotti liofilizzati nella prova 10-11 in Tabella 2.4 sono stati sottoposti ad analisi SEM. La torta liofilizzata è stata sezionata lungo l'asse verticale e diverse immagini per prodotto sono state ottenute, a differenti altezze. Queste immagini sono state segmentate utilizzando tecniche di analisi di immagine multivariante (Prats-Montalbán *et al.*, 2011) al fine di misurare media e varianza della distribuzione assiale dei pori del prodotto. Seguendo l'approccio proposto da Bharati e MacGregor (2000) le immagini sono prima state pretrattate al fine di costruire la cosiddetta "matrice di Bharati", una struttura dati in cui oltre all'informazione sulla intensità del singolo pixel è contenuta anche quella texturale, sui bordi e sulle fratture. Una Principal Component Analysis (PCA) (Pearson, 1901, Hotelling, 1933) effettuata sulla struttura di Bharati ha permesso di estrapolare dalla stessa la sola informazione legata all'intensità media dei singoli pixel così da eliminare il rumore ed i gradienti, tipicamente legati alla presenza di bordi. La segmentazione dei pori del prodotto è stata ottenuta scartando tutti i pixel il cui *score* fosse inferiore ad un limite scelto arbitrariamente.

Per assicurare che, in tutti i casi, anche i bordi molto sottili tra un poro e l'altro fossero rimossi, evitando di "creare" pori di dimensione doppia o comunque sovrastimata, è stata quindi creata una maschera che includesse solo le zone molto chiare e caratterizzate da forti gradienti di intensità (Fig. 3.16a). A questo scopo sono state sufficienti alcune funzioni tipiche dell'analisi di immagine classica e già direttamente implementate in Matlab (Gonzalez *et al.*, 2004). In particolare, la funzione *edge* presente nel codice Matlab,

consente di cercare i bordi all'interno di una immagine in bianco e nero. Questa seconda immagine è stata sottratta alla prima al fine di delineare più chiaramente la separazione tra i diversi pori (Fig. 3.16b). Inoltre, prima di contare i pori individuati e misurarne area e diametro equivalente, un filtro dimensionale ha rimosso i gruppi con meno di cinquanta o più di centomila pixel. Nel primo caso è impossibile discriminare un vero e proprio poro dal rumore derivante dalla segmentazione, nel secondo la dimensione è tale da escludere che si tratti di un solo poro, ma, più verosimilmente, di un insieme di pori che avrebbe l'unico effetto di spostare il baricentro della distribuzione misurata introducendo un errore nella caratterizzazione della stessa.

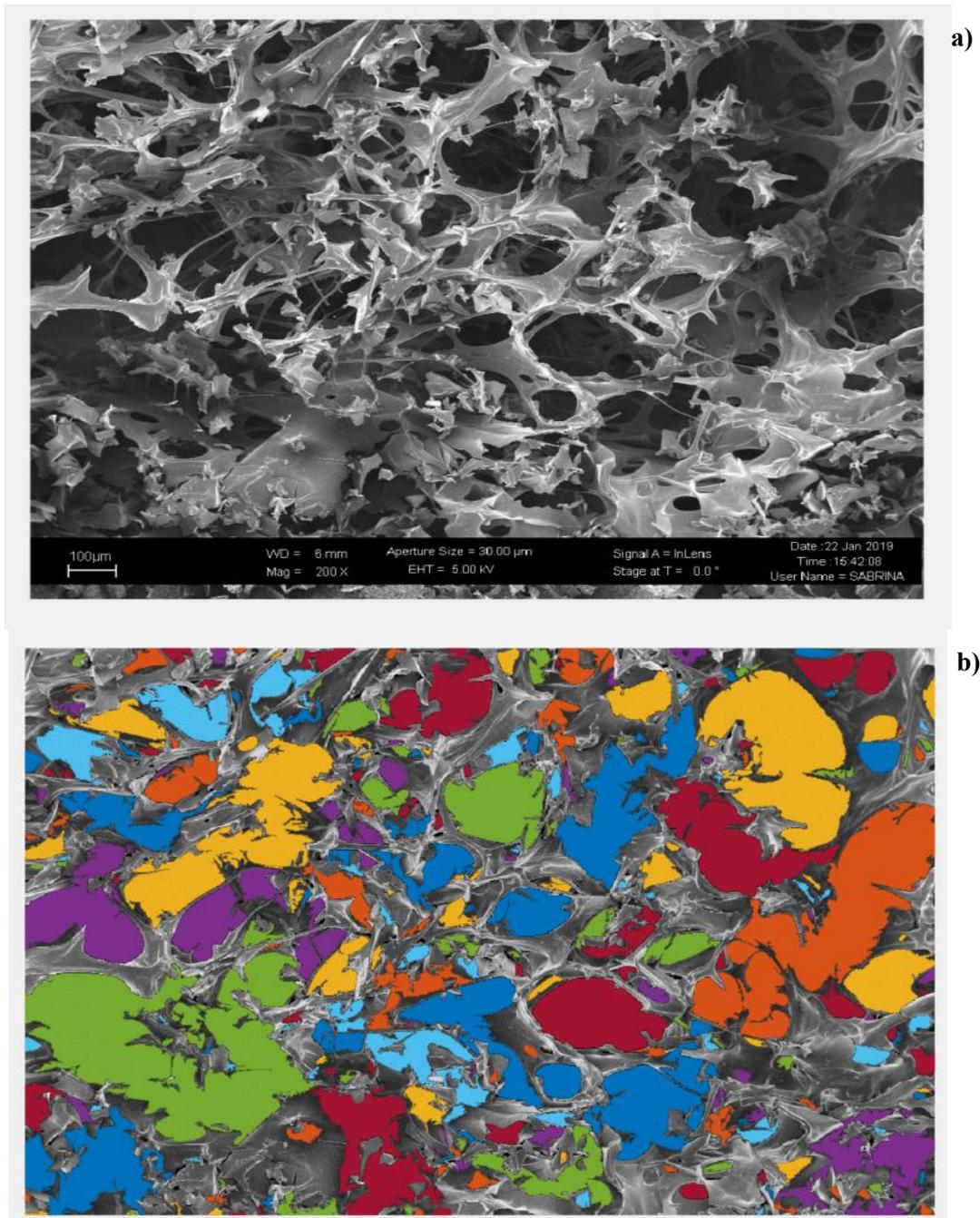


Figura 3.16: a) Immagine ottenuta dall'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), per saccarosio al 5% in peso, e b) immagine SEM segmentata in modo da rendere efficacemente distinguibile la separazione tra i pori.

Il confronto tra i valori sperimentali ottenuti tramite analisi d'immagine delle scansioni SEM, e quelli misurati tramite termocamera, è riportato in Figura 3.17.

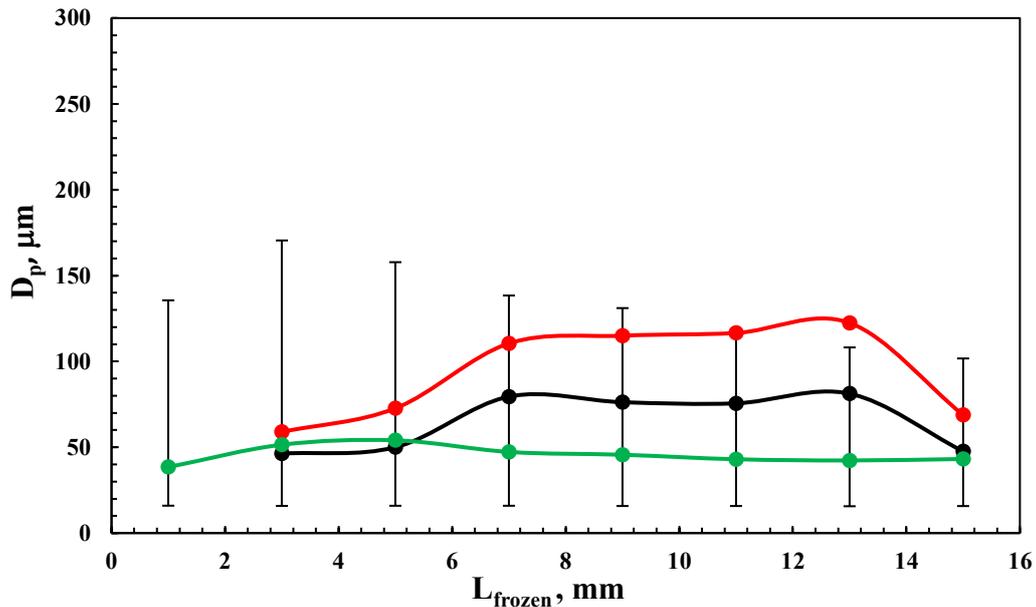


Figura 3.17: Confronto tra i valori sperimentali, ottenuti tramite analisi d'immagine al microscopio, con barre di errore di limite inferiore pari al 5° percentile e limite superiore pari al 95° percentile (curva verde), e quelli misurati tramite termocamera (curva rossa per il modello meccanicistico e nera per quello empirico) per le soluzioni al 5% in peso di saccarosio.

Infine, anche i prodotti liofilizzati nella prova 11 (10% di saccarosio) di Tabella 2.4, sono stati analizzati al microscopio a scansione come mostrato in Figura 3.18, mentre per il mannitolo ciò non è stato possibile.

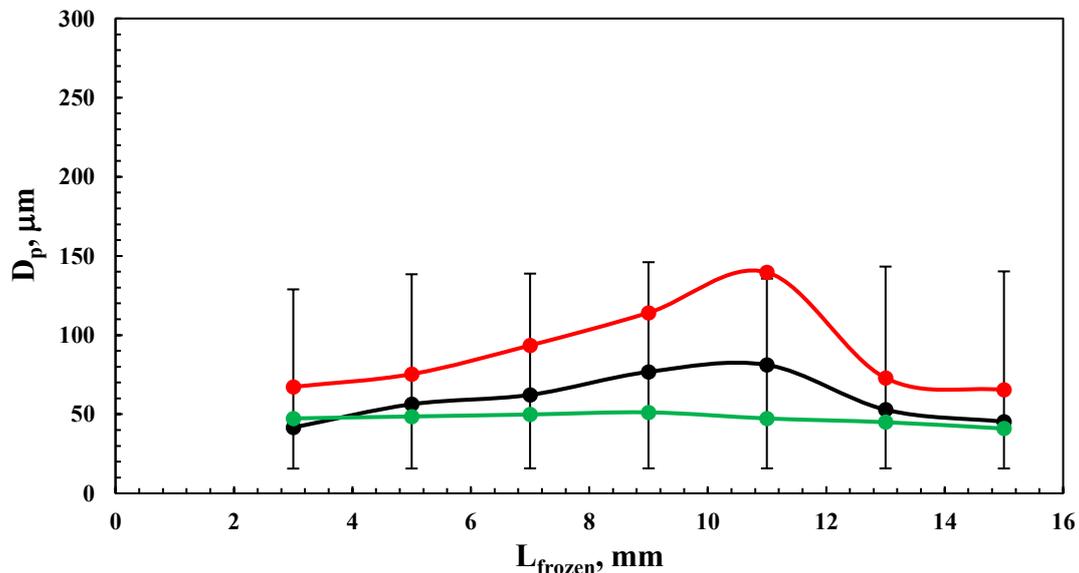


Figura 3.18: Confronto tra i valori sperimentali, ottenuti tramite analisi d'immagine al microscopio, con barre di errore di limite inferiore pari al 5° percentile e limite superiore pari al 95° percentile (curva verde), e quelli misurati tramite termocamera (curva rossa per il modello meccanicistico e nera per quello empirico) per le soluzioni al 10% in peso di saccarosio.

Come si può osservare, la curva sperimentale e quella misurata, nel caso di entrambi i modelli, sono caratterizzate da un andamento che presenta un massimo. In ogni caso, la massima dimensione dei cristalli si osserva nelle zone interne del prodotto, mentre i valori al fondo e alla sommità sono inferiori. Si nota inoltre che il profilo stimato a partire dalle misure ottenute con termocamera rientra nelle barre di errore nella misura sperimentale per il modello empirico, mentre non accade in tutti i punti per il modello meccanicistico, sia per le soluzioni al 5% che al 10% di saccarosio. Ciò potrebbe essere legato al valore elevato di γb in entrambi i casi.

La dimensione dei cristalli ottenuti a seguito del congelamento è il parametro morfologico di maggiore rilevanza nel caso del processo di liofilizzazione. Come spiegato nell'introduzione, e quantificato nell'equazione 2.11b, il valore di D_p influisce sulla resistenza al trasferimento del vapore d'acqua nel prodotto essiccato e, quindi, sulla durata del processo.

Nel paragrafo successivo si spiegherà come si è passati dalla conoscenza della morfologia del prodotto alla quantificazione della sua resistenza al flusso di sublimazione.

3.3 Valutazione di R_p .

In base all'equazione 2.11b l'andamento di R_p in funzione di L_{dried} sarebbe una retta se il valore di D_p fosse costante all'interno del prodotto. Tuttavia, non è questo ciò che si verifica nelle nostre prove, come mostrato dall'analisi SEM e dai risultati ottenuti tramite termocamera.

Per migliorare la descrizione di R_p si è perciò ricorsi alla descrizione del prodotto liofilizzato come una serie di resistenze. In pratica, per ogni intervallo Δz in cui il prodotto era stato precedentemente suddiviso, e per cui è stato calcolato un valore di diametro medio $D_{p,j}$, si è calcolato un valore di resistenza $R_{p,j}$.

$$R_{p,j} = \frac{R T_i^{0.5} \tau}{K \varepsilon M_w D_{p,j}} L_{dried} \quad (3.1)$$

dove i vari parametri sono stati descritti nel paragrafo 2.5.

In realtà, man mano che l'interfaccia di sublimazione si sposta dalla cima del prodotto verso il fondo, la resistenza risulta più elevata rispetto a quella calcolata secondo 3.1. Infatti, bisogna tenere conto dell'effetto delle dimensioni dei pori relative allo strato di prodotto precedentemente essiccato, che contribuisce ad un innalzamento della resistenza al trasporto di materia. Dunque, vale la seguente relazione:

$$R_{p,j} = \frac{R T_i^{0.5} \tau}{K \varepsilon M_w D_{p,j}} L_{dried} + R_{p,j-1} \quad (3.2)$$

dove $R_{p,j-1}$ è la resistenza relativa allo spessore di dimensioni Δz precedentemente essiccato.

Questo è stato effettuato per ogni formulazione. Al fine di semplificare l'introduzione del valore di resistenza al trasferimento di materia R_p così ottenuto, la formula 3.2 è stata approssimata tramite l'equazione 2.14.

I valori di A e B , contenuti all'interno dell'espressione 2.14, sono nuovamente stati ottenuti attraverso l'utilizzo di una procedura di minimizzazione dello scarto quadratico medio

rispetto alla curva ottenuta calcolando la resistenza, per ogni valore di altezza, dall'equazione 3.2. Il risultato, ottenuto per le diverse formulazioni, è mostrato nelle Figure 3.19 – 3.24.

Sono di seguito riportati i valori di A e B , per le diverse formulazioni, secondo l'applicazione del modello empirico applicato utilizzando come valore di α quello presente in letteratura per le varie soluzioni.

$$A_{5\%, \text{ saccarosio}} = 2.045 \cdot 10^7, \text{ s}^{-1}$$

$$B_{5\%, \text{ saccarosio}} = 46, \text{ m}^{-1}$$

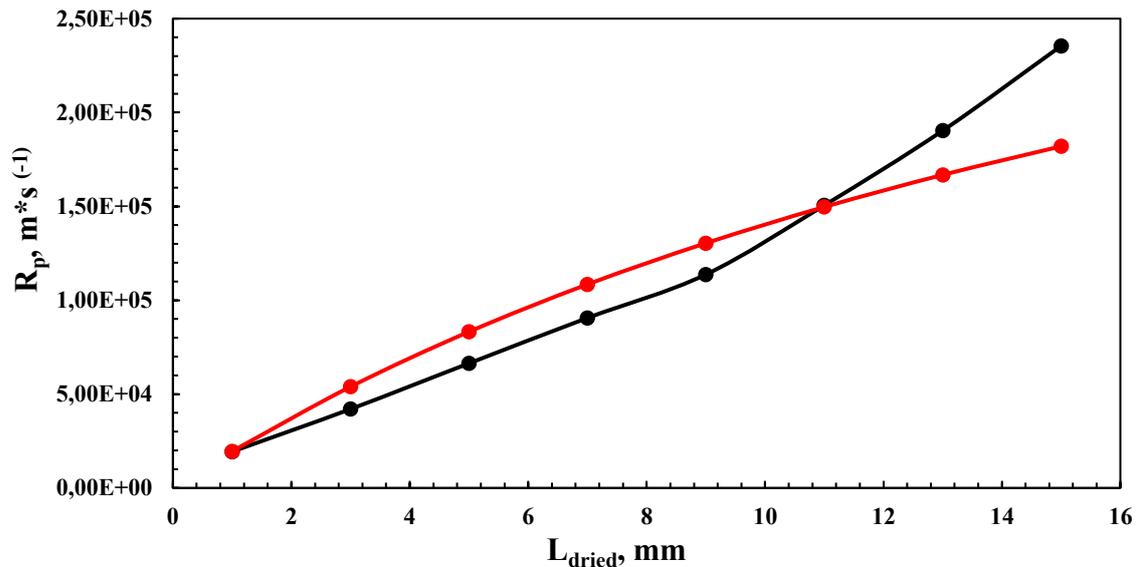


Figura 3.19: Resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} . Curva nera: R_p calcolato con equazione 2.11b. Curva rossa: R_p calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

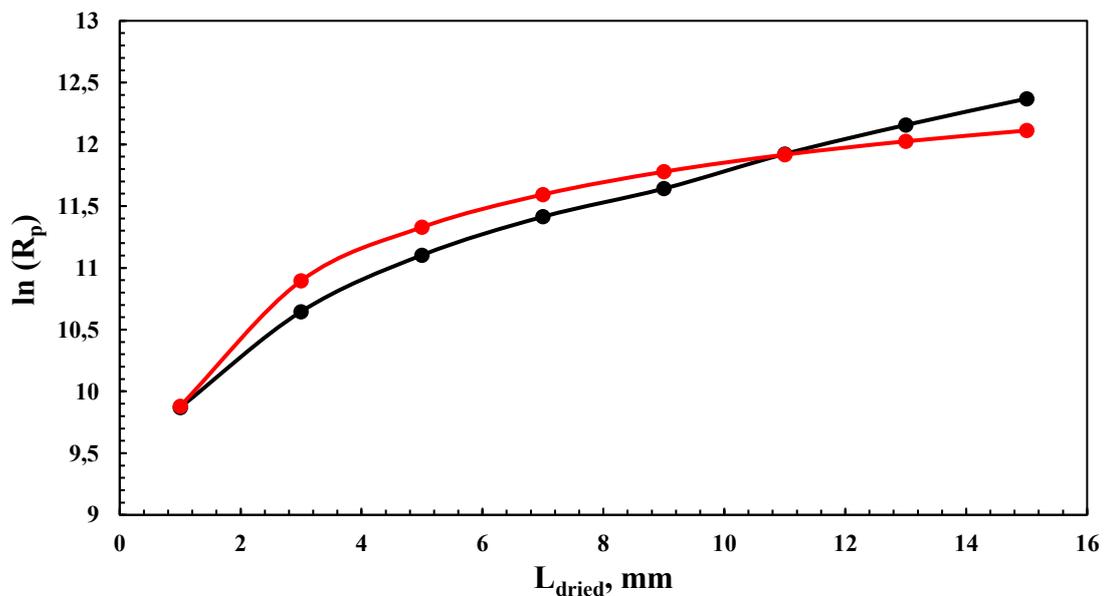


Figura 3.20: Andamento logaritmico della resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} . Curva nera: $\ln(R_p)$ calcolato con equazione 2.11b a cui viene applicato il logaritmo naturale. Curva rossa: $\ln(R_p)$ calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

$$A_{10\%, \text{saccarosio}} = 2.012 \cdot 10^7, \text{ s}^{-1}$$

$$B_{10\%, \text{saccarosio}} = 27.1, \text{ m}^{-1}$$

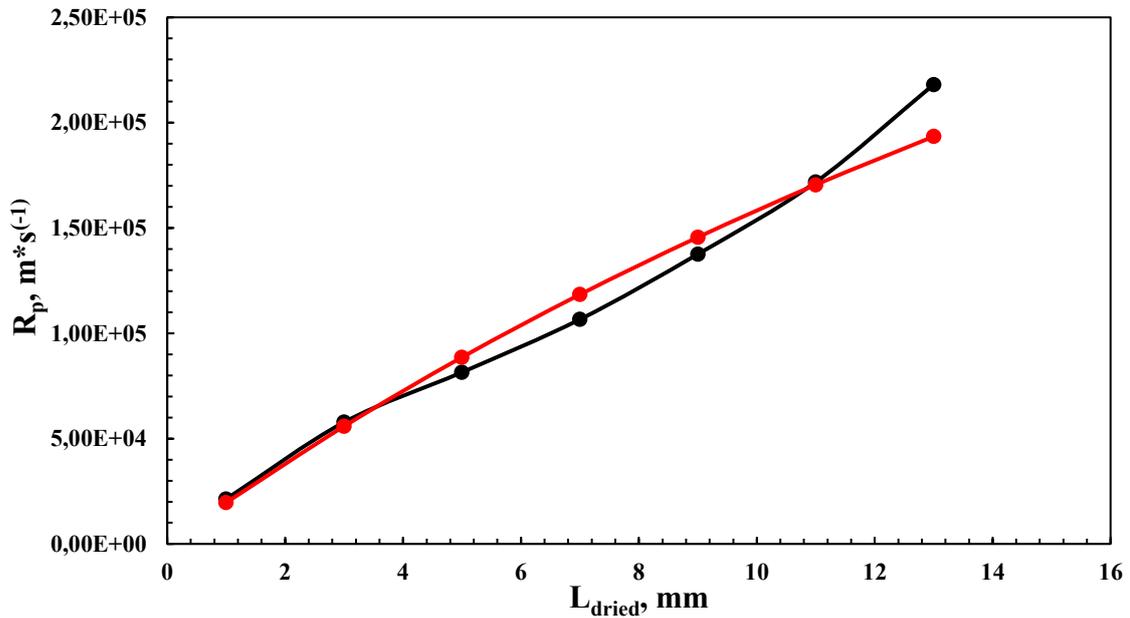


Figura 3.21: Resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} per soluzioni al 10% di saccarosio. Curva nera: R_p calcolato con equazione 2.11b. Curva rossa: R_p calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

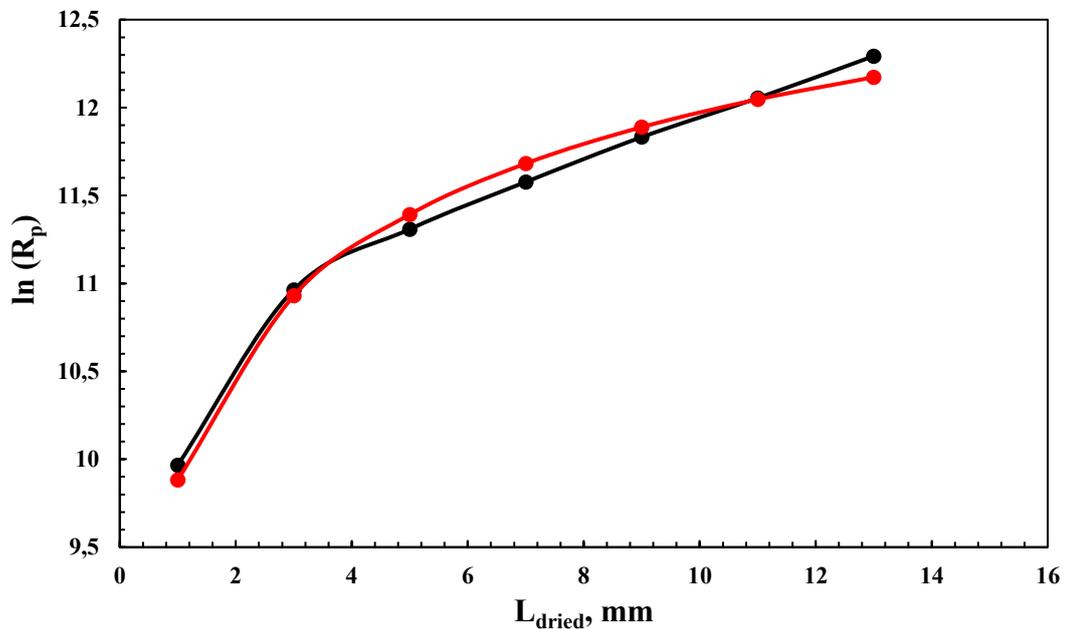


Figura 3.22: Andamento logaritmico della resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} per soluzioni al 10% di saccarosio. Curva nera: $\ln(R_p)$ calcolato con equazione 2.11b a cui viene applicato il logaritmo naturale. Curva rossa: $\ln(R_p)$ calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

$$A_{5\%, \text{ mannitolo}} = 4.1 \cdot 10^7, \text{ s}^{-1}$$

$$B_{5\%, \text{ mannitolo}} = 0, \text{ m}^{-1}$$

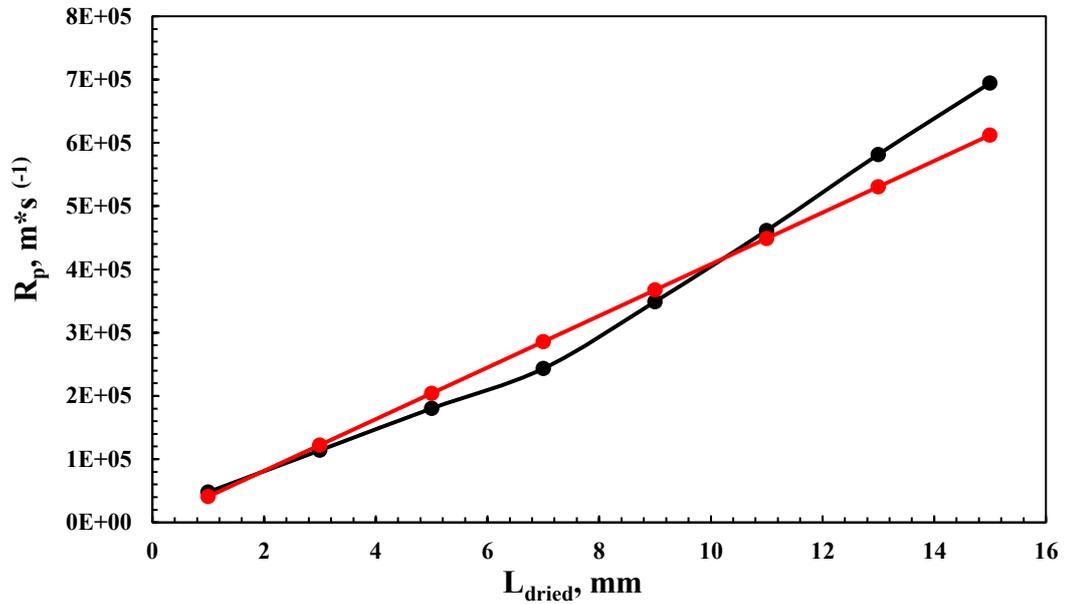


Figura 3.23: Resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} per soluzioni al 5% di mannitolo. Curva nera: R_p calcolato con equazione 2.11b. Curva rossa: R_p calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

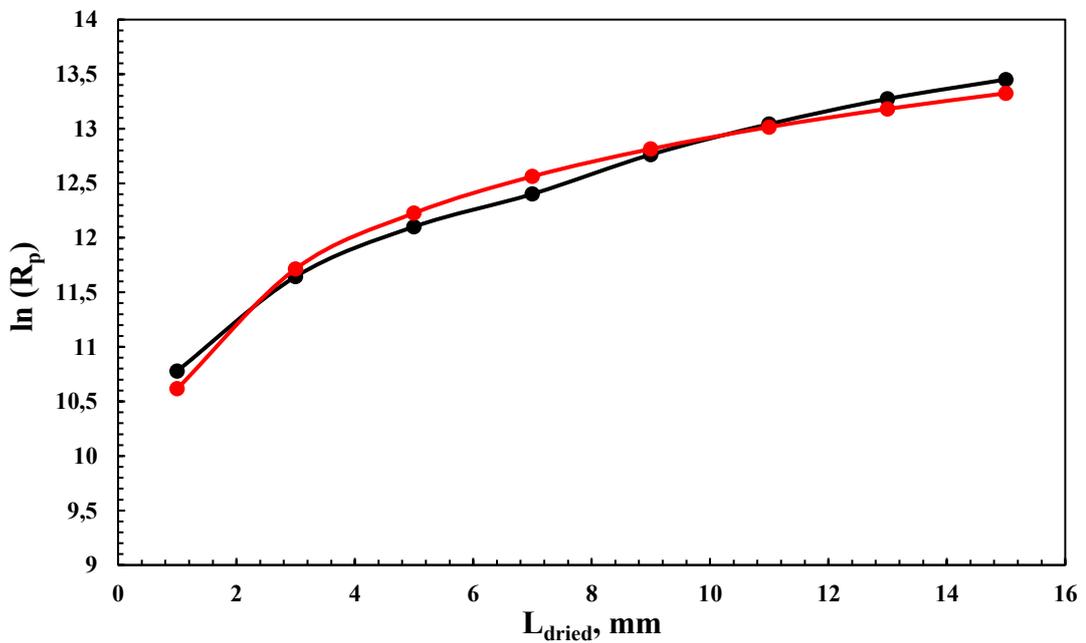


Figura 3.24: Andamento logaritmico della resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} per soluzioni al 5% di mannitolo. Curva nera: $\ln(R_p)$ calcolato con equazione 2.11b a cui viene applicato il logaritmo naturale. Curva rossa: $\ln(R_p)$ calcolato in funzione di A e B ottimali tramite 2.14.

La stessa procedura è stata applicata per la valutazione della resistenza al trasferimento di materia, utilizzando il modello meccanicistico. In Tabella 3.1 vengono riportati i parametri A e B per le medesime formulazioni analizzate precedentemente.

Tabella 3.1: Valori dei coefficienti A e B per le varie formulazioni in seguito all'applicazione del modello meccanicistico.

Formulazione	A, s^{-1}	B, m^{-1}
5% in peso di saccarosio	$1.1 \cdot 10^7$	19.7
10% in peso di saccarosio	$1.41 \cdot 10^7$	31.8
5% in peso di mannitolo	$3.9 \cdot 10^7$	9.3

Come si può notare i valori di A e B ottenuti con il modello meccanicistico rispetto a quelli ottenuti tramite applicazione del modello empirico risultano diversi. Ciò evidenzia come curve aventi valori di diametri diversi, pur presentando lo stesso andamento qualitativo, a parità di altezza di prodotto, ovviamente rispecchiano una differente resistenza al trasporto di materia (Fig.3.25).

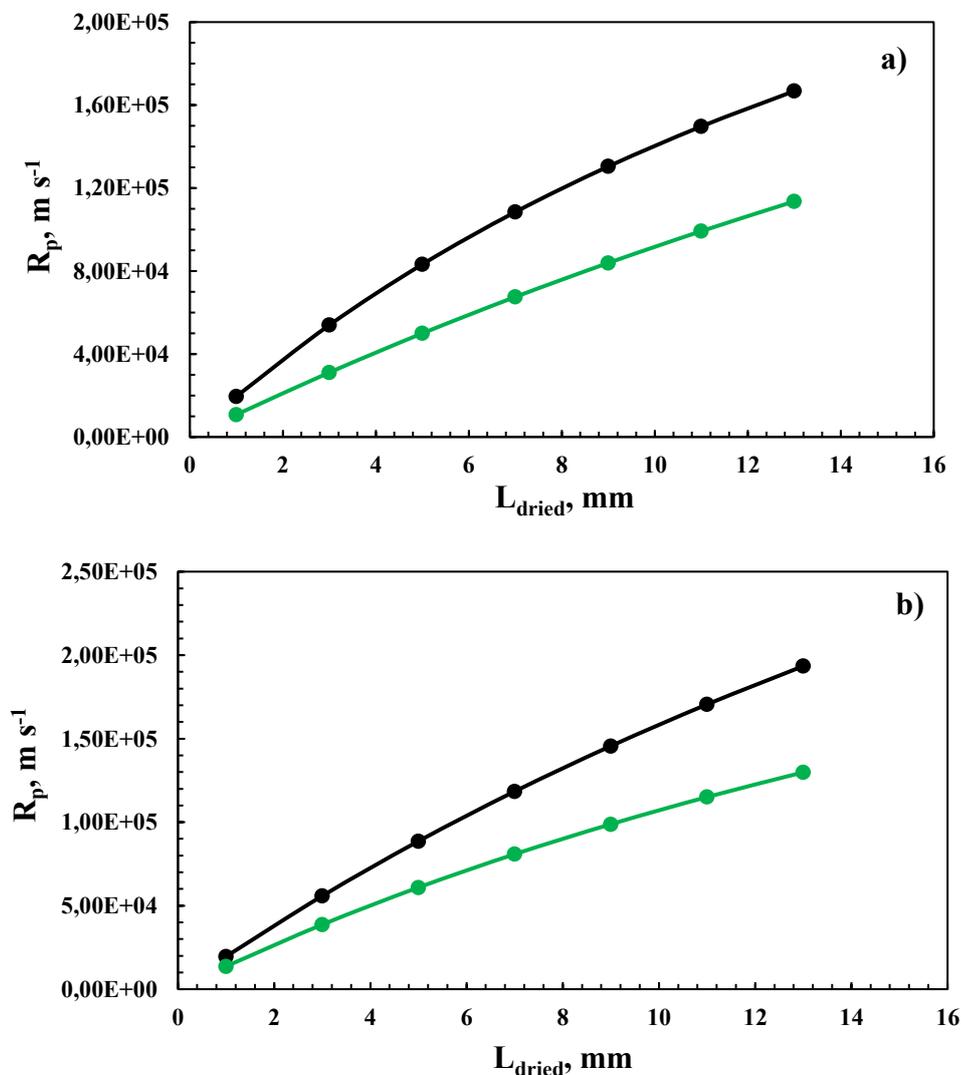


Figura 3.25: Resistenza al trasporto di materia R_p vs spessore prodotto essiccato L_{dried} per soluzioni a) al 5% e b) 10% di saccarosio, valutata secondo l'applicazione del modello empirico (curva nera) e di quello meccanicistico (curva verde).

Inoltre, il valore di R_p può anche essere ottenuto dai dati sperimentali, qualora sia disponibile la misura di temperatura durante la fase di essiccamento primario, sfruttando la definizione stessa di resistenza al trasporto di materia:

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{wi} - p_{wc}) \quad (1.1)$$

dove $p_{w,c}$ è la pressione in camera misurata dal Baratron, J_w è il flusso di vapore d'acqua rimosso durante il processo e $p_{w,i}$ la tensione di vapore del ghiaccio all'interfaccia di sublimazione. Quest'ultima è funzione esclusivamente della temperatura all'interfaccia T_i , approssimabile con quella misurata dalla termocoppia, attraverso l'equazione

$$p_{w,i} = \exp\left\{28.932 - \frac{6150.6}{T_b}\right\} \quad (3.3)$$

dove T_b è la temperatura al fondo del prodotto.

Il valore di J_w può essere calcolato noto il flusso di calore J_q scambiato tra il fluido riscaldante e la base del prodotto.

$$J_q = K_v(T_f - T_b) \quad (1.2)$$

Quest'ultimo, come si nota dall'equazione 1.2, è proporzionale alla differenza di temperatura tra il fluido T_f e la base del flacone T_b , secondo il fattore di scambio termico globale K_v calcolato dall'equazione 2.18.

Come si può osservare in Figura 3.26, dopo un breve transitorio, il flusso di materia legato al processo di sublimazione è circa costante. Questo significa che il calore fornito dal fluido riscaldante viene sfruttato completamente per far sublimare il ghiaccio, ovvero vale l'uguaglianza:

$$J_q = K_v(T_f - T_b) = J_w \Delta H_s \quad (3.4)$$

dove ΔH_s è l'entalpia di sublimazione del ghiaccio.

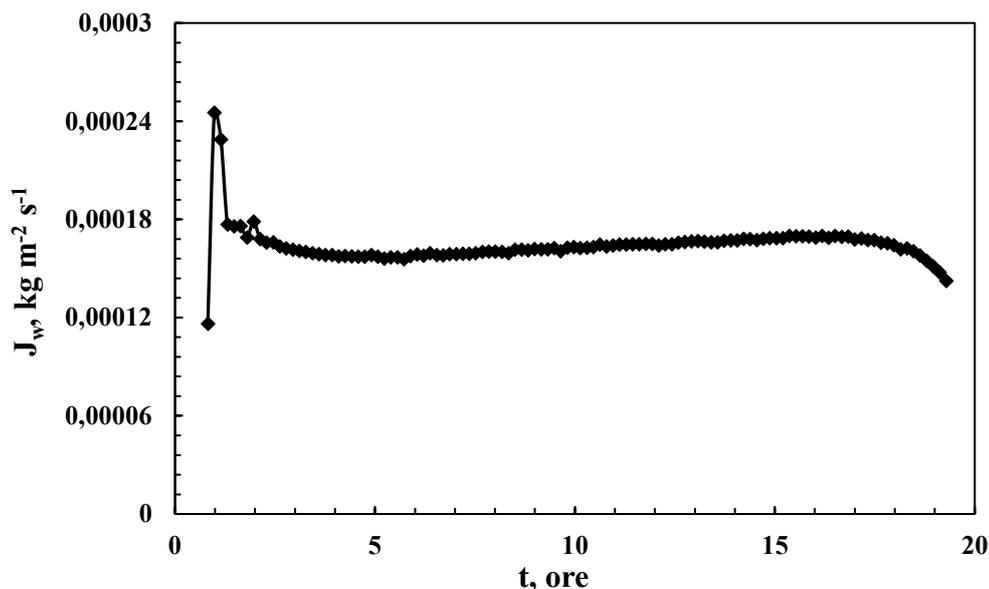


Figura 3.26: Variazione nel tempo del flusso di materia J_w durante il processo di sublimazione.

A questo punto, noto il flusso di materia J_w ad ogni istante di tempo considerato e noti i valori di pressione parziale in camera e all'interfaccia di sublimazione, è possibile ricavare l'andamento di R_p , riportato in Figura 3.27.

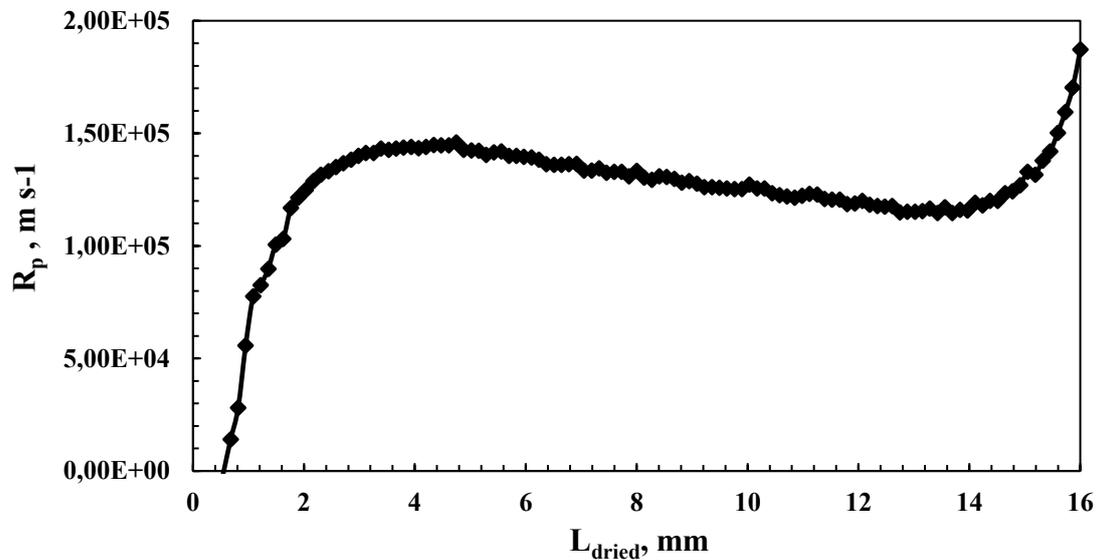


Figura 3.27: Andamento della resistenza al trasferimento di materia R_p , sperimentale in funzione dello spessore di prodotto secco L_{dried} per soluzioni al 10% di saccarosio.

Per ottenere l'andamento della resistenza al trasferimento di materia sperimentale in Figura 3.27, come detto precedentemente, si sono utilizzati i valori di temperatura e pressione in camera misurati durante la prova 11 in Tabella 2.4 (saccarosio al 10%). Non è stato possibile ottenere una curva simile anche per la prova 10 in Tabella 2.4 (saccarosio al 5%) in quanto in quest'ultimo caso lo *shrinkage* osservato nel prodotto ha determinato il distacco dalle pareti. La termocoppia, posta a contatto con il vetro del flacone, non ha potuto pertanto effettuare misure significative durante l'intero corso del processo di essiccamento primario (Fig. 3.28).

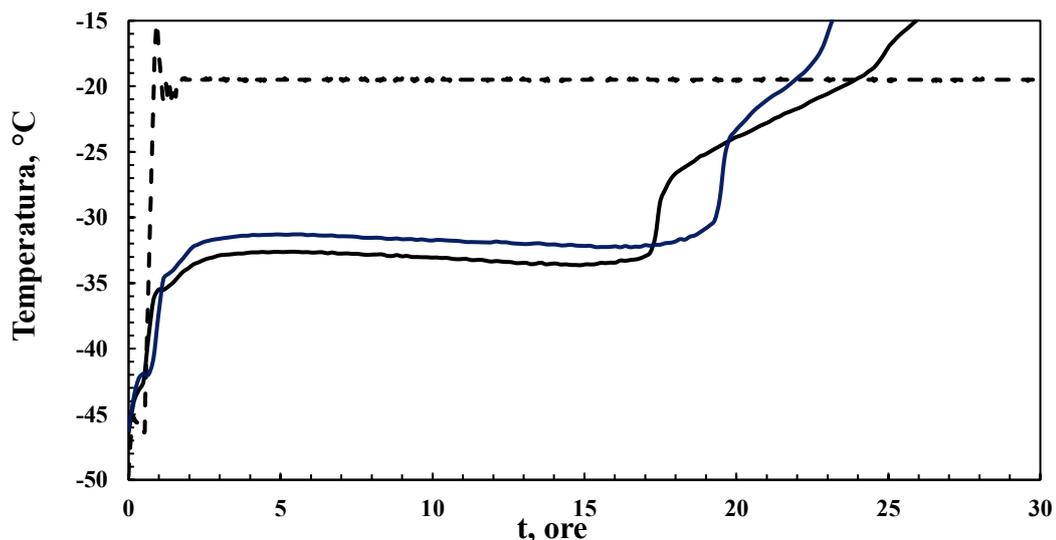


Figura 3.28: Andamento nel tempo della temperatura misurata dalla termocoppia all'interno del flacone per la soluzione al 5% (curva nera continua) e al 10% (curva blu) di saccarosio e della temperatura del fluido riscaldante (curva nera tratteggiata).

Il profilo ottenuto applicando questa procedura non coincide esattamente con quello ricavato dall'analisi morfologica, anche se l'ordine di grandezza del valore di R_p è lo stesso. La differenza osservata può essere legata al fatto che nell'applicazione della formula 3.3 si sono utilizzati i valori del flacone contenente la termocoppia, il quale è soggetto ad una storia termica diversa da quella degli altri flaconi. In ogni caso è bene considerare che ogni flacone all'interno del *batch* è caratterizzato da un proprio specifico comportamento al trasferimento di materia. Ciò è fonte dell'eterogeneità *inter-vial* che si rispecchia nella significativa differenza tra *onset* (inizio dell'abbassamento della curva Pirani) e *offset* (rapporto Pirani-Baratron pari a uno). All'*onset* un numero significativo di flaconi all'interno del *batch* ha completato il processo di essiccamento, mentre all'*offset* la sublimazione è finita in tutti i flaconi. Se non vi fosse eterogeneità *inter-vial* la differenza tra i tempi di *offset* e *onset* sarebbe nulla, mentre sperimentalmente si osserva che diverse ore possono trascorrere dal momento in cui la curva del Pirani comincia ad abbassarsi fino al raggiungimento del rapporto Pirani/Baratron unitario. Anche questo potrebbe spiegare lo scostamento tra R_p sperimentale (Fig. 3.27) e R_p calcolato secondo l'equazione 2.14.

Il calcolo del valore di R_p così effettuato è utile perché permette di stimare il tempo di essiccamento e la temperatura massima all'interno del prodotto attraverso l'utilizzo di un modello dell'essiccamento primario, come verrà descritto nel paragrafo successivo.

3.4 Confronto tra risultati sperimentali e quelli calcolati con il modello di essiccamento primario.

Il profilo di R_p ottenuto tramite l'equazione di 2.14, e con i valori di A e B mostrati nel paragrafo precedente per determinati valori di α (o γb), è stato inserito in un modello dell'essiccamento primario, implementato in MATLAB R2017b.

Questo codice consente la determinazione della durata dell'essiccamento primario t_d e della temperatura massima raggiunta T_{max} . Questi valori hanno estrema importanza perché consentono da un lato di valutare la fattibilità economica del processo e dall'altro di conoscere lo stress subito dal prodotto. Ciò è importante se si desidera ottimizzare il processo, riducendo al massimo i tempi, ma senza indurre collasso della struttura.

I valori di t_d e T_{max} ottenuti dal codice Matlab per la formulazione di saccarosio al 5% e al 10% e di mannitolo al 5%, sono riportati nella Figura 3.29 e nella terza colonna di Tabella 3.3. Questi ultimi sono stati confrontati con quelli misurati sperimentalmente nel caso delle prove 10-11 (saccarosio) e di prova 15 (mannitolo) di Tabella 2.4.

La scelta della durata sperimentale della fase di essiccamento per le varie formulazioni è stata effettuata analizzando gli andamenti nel tempo del rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron (P_p/P_B).

Come si può notare in Figura 3.29, il tempo corrispondente al punto di flesso, circa uguale (28 ore) per le tre curve, è stato considerato come valore sperimentale di durata della fase di essiccamento. Inoltre, si osserva che l'*onset* e l'*offset* si verificano rispettivamente a circa 25 e 37 ore per le soluzioni al 5% di mannitolo e saccarosio, mentre per quelle al 10% di saccarosio intorno a 24 e 36 ore. Ciò significa che la valutazione del tempo di essiccamento per le soluzioni di saccarosio analizzate al microscopio può essere ritenuta accettabile se cade all'interno dell'intervallo di tempo compreso tra *onset* e *offset*.

Tabella 3.3: Confronto tra temperatura massima sperimentale e quella valutata tramite l'utilizzo del codice, calcolando la distribuzione del diametro dei pori con il modello empirico.

			Matlab	Sperimentale	Errore assoluto
α , $\mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$	4.59	$T_{max,5\% \text{saccarosio}}$, $^{\circ}\text{C}$	-31.7	-33	1.3
	4.59	$T_{max,10\% \text{saccarosio}}$, $^{\circ}\text{C}$	-30.7	-32	1.3
	1.7	$T_{max,5\% \text{mannitolo}}$, $^{\circ}\text{C}$	-20.6	-20	0.6

Analizzando l'applicazione del modello empirico, come si evince sia dall'errore tra i due valori riportati nell'ultima colonna di Tabella 3.3 che dalla Figura 3.29, il codice Matlab, con i parametri stimati a seguito del monitoraggio della fase di congelamento consente una stima accurata sia di t_d che di T_{max} , fatta eccezione per le soluzioni di mannitolo, come verrà spiegato successivamente. Ciò fornisce un'ulteriore convalida della procedura usata, in quanto mostra la correttezza del valore di resistenza al trasferimento di materia e quindi di D_p ricavato nei punti precedenti, ed evidenzia come il valore di α di letteratura possa essere molto vicino a quello reale.

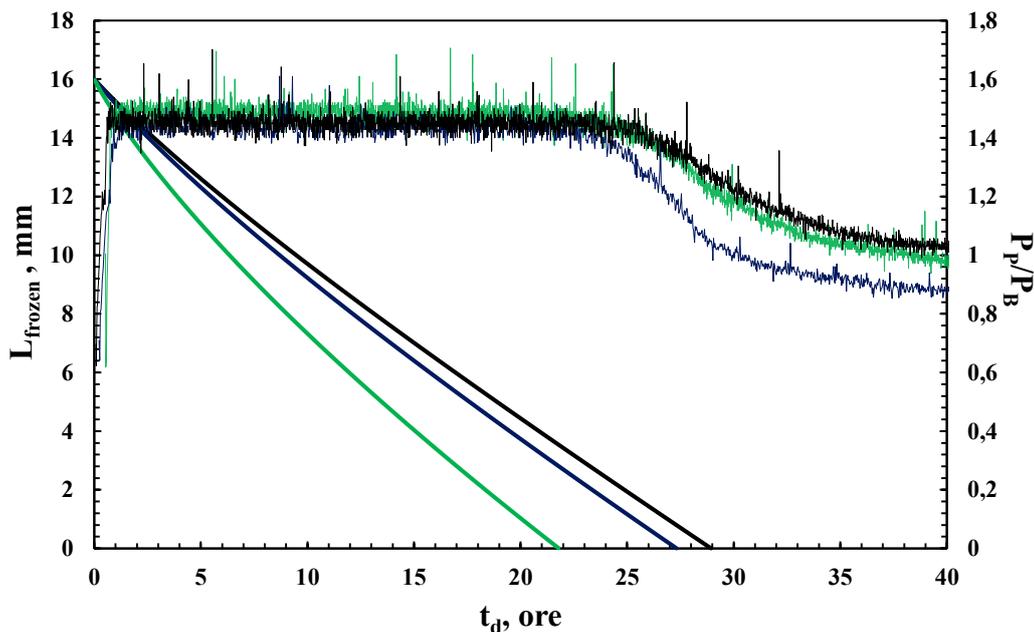


Figura 3.29: Variazione nel tempo dell'altezza di prodotto essiccato applicando il modello empirico e del rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron (P_P/P_B). Curva verde: mannitolo al 5%. Curva blu: saccarosio al 10%. Curva nera: saccarosio al 5%.

Il tempo di essiccamento e la temperatura massima raggiunta dal prodotto secco valutati sperimentalmente per le medesime formulazioni, sono stati confrontati anche con quelli calcolati dal codice Matlab applicando il modello meccanicistico, come riportato in Tabella 3.4 e in Figura 3.30.

Tabella 3.4: Confronto tra temperatura massima sperimentale e ottenuta tramite codice, calcolando la distribuzione del diametro dei pori con il modello meccanicistico.

			Matlab	Sperimentale	Errore assoluto
γb , $\text{J K}^{(2/3)} \text{m}^{(-8/3)}$	230000	$T_{max,5\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-33.2	-33	0.2
	230000	$T_{max,10\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-32.5	-32	0.5
	70000	$T_{max,5\% \text{ mannitolo}}, ^\circ\text{C}$	-21.5	-20	1.5

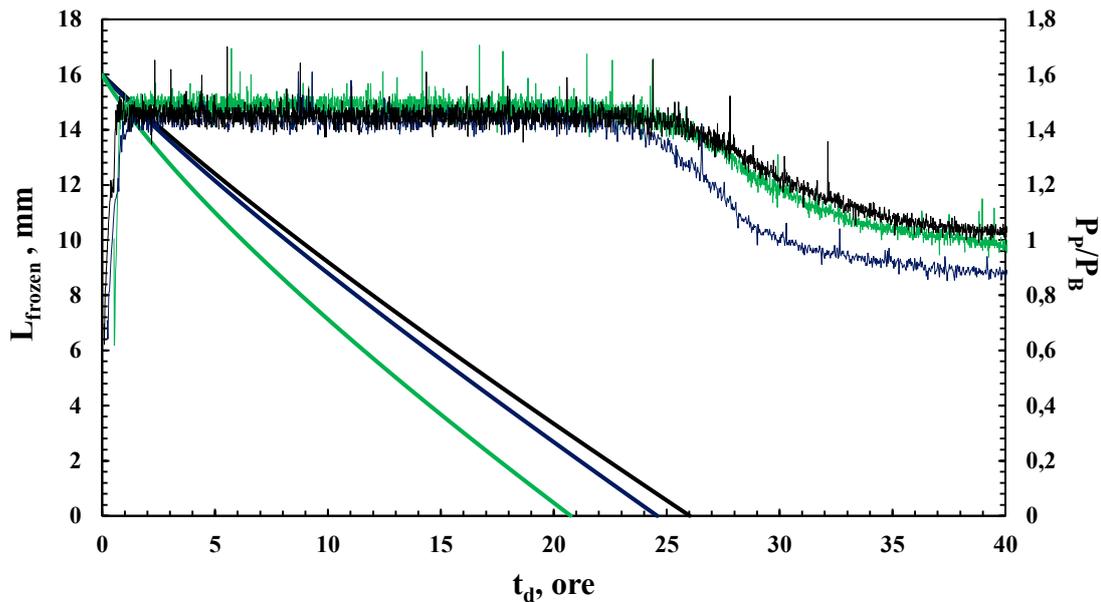


Figura 3.30: Variazione nel tempo dell'altezza di prodotto essiccato applicando il modello meccanicistico e del rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron (P_P/P_B). Curva verde: mannitolo al 5%. Curva blu: saccarosio al 10%. Curva nera: saccarosio al 5%.

Dai valori ottenuti nelle Tabelle 3.3-3.4 e dalle Figure 3.29-3.30, emergono due risultati.

Il primo riguarda la durata della fase di essiccamento, ottenuta per il modello meccanicistico con i valori di primo tentativo, che risulta essere molto vicina all'*onset*. Questo è dovuto ad un valore elevato del fattore γb ; infatti una sua riduzione comporterebbe una diminuzione delle dimensioni dei cristalli, con conseguente aumento del tempo di essiccamento. Inoltre, da notare che l'utilizzo dello stesso fattore di scala, α o γb , per le soluzioni di saccarosio al 5% e al 10%, porta all'ottenimento di risultati molto simili e ciò evidenzia come sia α che γb non dipendano dalla concentrazione di zucchero presente (per soluzioni diluite), confermando la validità dell'ipotesi precedentemente effettuate.

Il secondo risultato mostra che i tempi di essiccamento predetti per il mannitolo si trovano a valori inferiori all'*onset*, mentre si ottengono dei risultati accettabili per le soluzioni di saccarosio. Una possibile spiegazione è che il valore del coefficiente α (o γb) di partenza sia più elevato rispetto a quello reale. Questo comporterebbe una durata della fase di essiccamento inferiore e, conseguentemente, una temperatura massima raggiunta dal prodotto secco più bassa. Per avere dei tempi di essiccamento corretti si è notato che il coefficiente α , per il mannitolo al 5%, dovrebbe essere intorno all'unità. Ciò implicherebbe un diametro massimo e minimo dei pori intorno, rispettivamente, 18 μm e 11 μm .

Dunque, considerando che i profili dimensionali ottenuti hanno una loro incertezza, possono essere ritenuti accettabili dei tempi di essiccamento che si trovano all'interno dell'intervallo compreso tra *onset* e *offset*, mentre la temperatura massima risulta accettabile fino ad una differenza di 1-2 °C rispetto a quella misurata sperimentalmente.

Inoltre, bisogna osservare che, noto il profilo dimensionale sperimentale, può rivelarsi utile variare i parametri α e γb in modo da ottimizzare la distanza tra i valori di diametri calcolati con i modelli utilizzando i parametri di letteratura e quelli ricavati dall'analisi delle immagini SEM dei prodotti liofilizzati nella prova 10 (5% di saccarosio) e 11 (10% di saccarosio) in Tabella 2.4.

A tal proposito si è verificato il risultato ottenuto da questo processo di minimizzazione dello scarto quadratico medio. Infatti, considerando soluzioni della medesima concentrazione, sono stati determinati i parametri empirici relativi ai modelli utilizzati al variare dei valori soglia inseriti nel codice. I risultati ottenuti risultano essere diversi come si può osservare in Tabella 3.5. Ciò ovviamente conduce a valori di durata dell'essiccamento e temperatura massima raggiunta dal prodotto secco differenti e non univocamente determinate.

Tabella 3.5: Coefficienti α e γb per le soluzioni di saccarosio, calcolati in seguito ad analisi delle immagini SEM con diversi valori soglia inseriti nel codice.

Formulazione	$\alpha, \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$		$\gamma b, \text{J K}^{(2/3)} \text{m}^{(-8/3)}$	
5% in peso di saccarosio	Caso 1	2.72	Caso 1	88122
	Caso 2	3.14	Caso 2	104251
10% in peso di saccarosio	Caso 1	2.63	Caso 1	85152
	Caso 2	3.48	Caso 2	112652

In Figura 3.31 viene riportato il confronto tra andamento sperimentale e calcolato tramite l'applicazione di entrambi i modelli per le soluzioni di saccarosio al 10% nel caso 1 e nel caso 2.

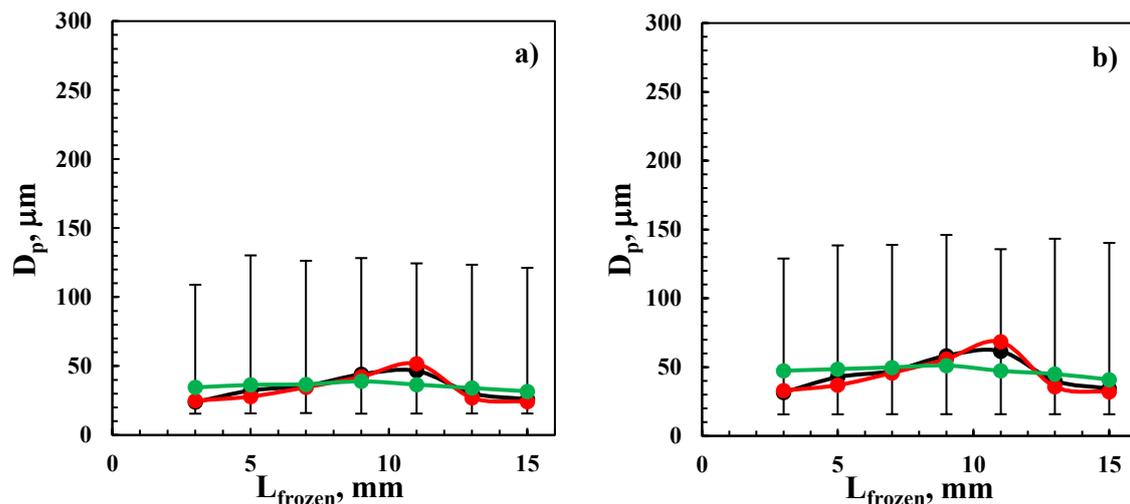


Figura 3.31: Distribuzione del diametro dei cristalli di ghiaccio D_p in funzione dello spessore di prodotto congelato L_{frozen} per soluzioni al 10% in peso di saccarosio a) nel caso 1 e b) nel caso 2, secondo applicazione del modello meccanicistico (curva rossa), empirico (nera) e analisi SEM (curva verde) con relative barre di errore il cui limite inferiore è pari al 5° percentile e il limite superiore al 95° percentile.

Come si può osservare l'andamento sperimentale mostrato in Figura 3.31b è caratterizzato da diametri più grandi rispetto a quello di Figura 3.31a, e questo si traduce in una differente durata dell'essiccamento e in una stima differente della temperatura massima raggiunta dal prodotto secco. A questo scopo, partendo dal fattore di scala α (o γb) di Tabella 3.5, sono stati ottenuti i parametri A e B effettivi per i due modelli nei due casi, e quindi nuovi valori di resistenza R_p . Noti questi coefficienti, utilizzando il modello matematico per l'essiccamento primario si è potuto stimare il tempo di essiccamento e la temperatura massima raggiunta per le soluzioni di saccarosio (Tabella 3.6).

Tabella 3.6: Confronto tra temperatura massima stimata e sperimentale al variare del parametro empirico α (o γb) dopo tentativo di ottimizzazione, per soluzioni di saccarosio.

			Matlab	Sperimentale	Errore assoluto
$\gamma b, \text{J K}^{(2/3)} \text{m}^{(-8/3)}$	88122	$T_{max,5\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-29	-33	4
	85152	$T_{max,10\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-28.3	-32	3.7
	104251	$T_{max,5\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-30	-33	3
	112652	$T_{max,10\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-29.5	-32	2.5
$\alpha, \mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$	2.72	$T_{max,5\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-29	-33	4
	2.63	$T_{max,10\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-28.4	-32	3.6
	3.14	$T_{max,5\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-29.9	-33	3.1
	3.48	$T_{max,10\% \text{ saccarosio}}, ^\circ\text{C}$	-29.6	-32	2.4

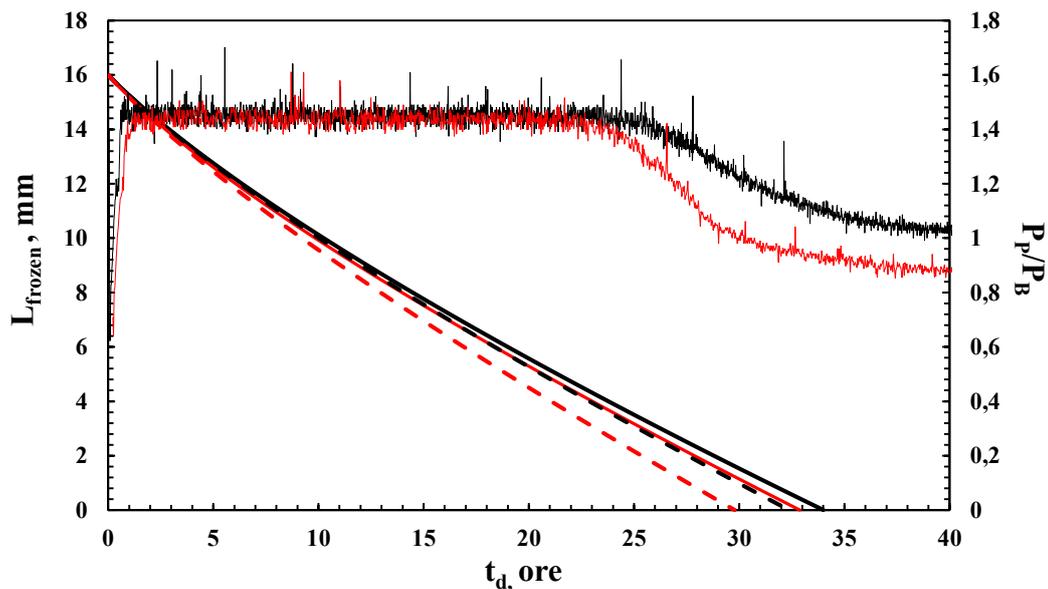


Figura 3.32: Variazione nel tempo dell'altezza di prodotto essiccato, in seguito a variazione del parametro α del modello empirico dopo confronto con l'andamento sperimentale (SEM) per il caso 1 (curve continue) e per il caso 2 (curve a tratti) di Tabella 3.5, e del rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron (P_p/P_B). Curva rossa: saccarosio al 10%. Curva nera: saccarosio al 5%.

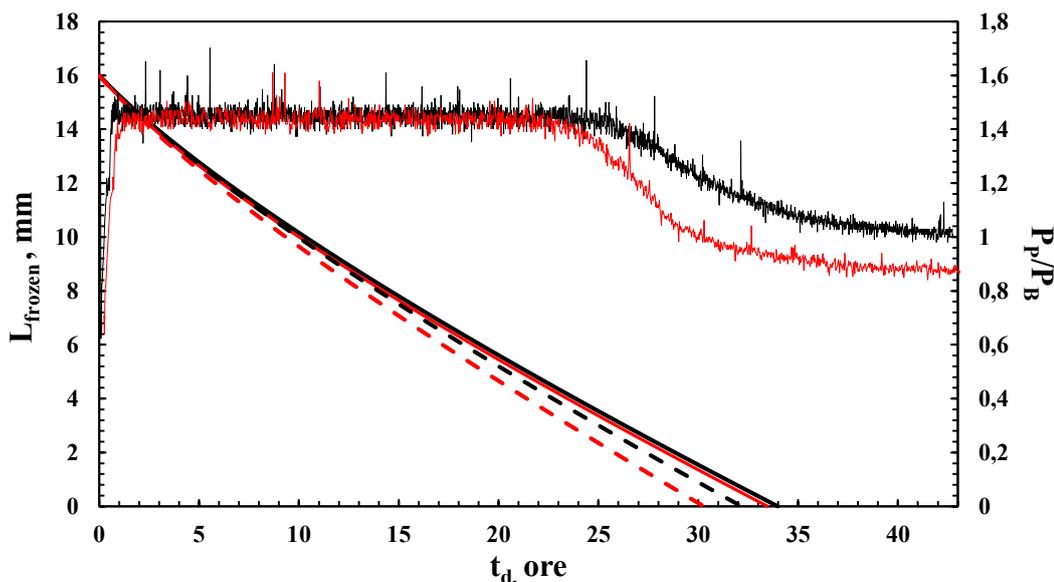


Figura 3.33: Variazione nel tempo dell'altezza di prodotto essiccato, in seguito ad ottimizzazione del parametro γb del modello meccanicistico dopo confronto con l'andamento sperimentale (SEM) per il caso 1 (curve continue) e per il caso 2 (curve a tratti) di Tabella 3.5, e del rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron (P_P/P_B). Curva rossa: saccarosio al 10%. Curva nera: saccarosio al 5%.

Si può osservare nelle Figure 3.32-3.33 e nella Tabella 3.6, che il tentativo di ottimizzazione in seguito all'analisi delle immagini SEM, e dunque la valutazione finale del parametro α (o γb), può generare dei risultati abbastanza diversi da quelli ottenuti con dei valori di α (o γb) di letteratura e da quelli osservati sperimentalmente. Per esempio, il valore di temperatura massima calcolato dal codice Matlab in seguito a questo tentativo di ottimizzazione può differire da quello sperimentale anche di 4°C, rendendo inaccettabile la stima ottenuta. Ciò, evidentemente, può essere considerato un errore normale in quanto la misura dei pori e i valori soglia scelti dall'operatore, al fine di valutarne le dimensioni, sono molto soggettivi, come viene anche confermato dalle barre di errore presenti in Figura 3.17-3.18 per i profili ottenuti dall'analisi delle immagini al microscopio. Tutto ciò per sottolineare che l'analisi di immagine ha parecchie incertezze legate sia al codice che permette di stimare le dimensioni dei pori che alla complessa manipolazione del campione da investigare. Da notare che dall'analisi d'immagine si ottengono delle dimensioni medie con una barra di errore molto elevata. Quindi, se ci si focalizza sulla media senza considerare queste incertezze si può arrivare a delle conclusioni fuorvianti in quanto, se vengono forzate le curve ottenute tramite applicazione dei due modelli a passare per i diametri medi sperimentali, si possono trovare dei risultati sbagliati e per la presenza di una barra di errore molto ampia e per i parametri soggettivi da inserire all'interno dell'algoritmo che possono fornire differenti distribuzioni dimensionali medie (come visto nei due casi precedenti) diminuendo ulteriormente l'utilità di questa procedura.

Nonostante questo scostamento dal valore sperimentale, si può osservare che la durata dell'essiccamento, ottenuta calcolando la resistenza al trasporto di materia con entrambi i modelli, rientra nell'intervallo compreso tra il tempo di *onset* e quello di *offset*, ovvero quei valori tali per cui risulta possibile che si verifichi la fine della fase di essiccamento.

Dunque, i risultati ottenuti tramite termografia indicano l'idoneità della termocamera a fornire informazioni utili per l'intero processo di liofilizzazione semplicemente attraverso il monitoraggio della fase di congelamento. Infatti, dalla semplice misura di D_p è possibile

risalire ad un valore di R_p che, inserito in un modello per l'essiccamento primario, consente di stimarne durata e stress termici indotti nel prodotto.

In conclusione, il monitoraggio della fase di congelamento tramite termocamera potrebbe quindi consentire il design ottimale dell'intero ciclo di liofilizzazione.

4 Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi è stato quello di determinare la distribuzione della dimensione dei cristalli di ghiaccio affinché fosse possibile predire la durata e la temperatura massima raggiunta dal prodotto solido alla fine dell'intero processo di liofilizzazione, monitorando, attraverso l'utilizzo della termocamera, la sola fase di congelamento.

Inizialmente è stata verificata l'accuratezza della misura di temperatura fornita dalla termocamera durante il congelamento. Essa dipende dalla conoscenza di diversi parametri, tra cui quelli di maggiore importanza risultano essere l'emissività e la temperatura apparente riflessa. Quest'ultima, identificativa dell'energia proveniente dall'ambiente circostante e che viene riflessa dal corpo analizzato, viene misurata e corretta automaticamente dal software presente nella termocamera durante l'intero processo. Diversamente, l'emissività è stata valutata tramite confronto tra due superfici alla stessa temperatura di cui sia nota l'emissività di almeno una delle due (*metodo di riferimento*, normativa ISO 18434-1 Part 1, Annex A.2).

Dopo aver ottenuto il valore di emissività si è proceduto col verificare l'accuratezza della misura di temperatura fornita dalla termocamera durante il processo di congelamento. Dunque, sono state inserite delle termocoppie sia sulla parete esterna dei flaconi 10R sia all'interno, verificando che non vi fossero differenze tra il valore di temperatura nella soluzione e quello misurato alla parete dei flaconi. L'utilizzo della termocamera come sistema di monitoraggio del processo è stato giustificato, e quindi convalidato, dalle misure ottenute, molto simili a quelle fornite dalle termocoppie.

A questo punto le immagini ottenute dalla termocamera sono state analizzate da un codice Matlab in grado di calcolare i valori della velocità di avanzamento del fronte di congelamento (R) e di gradiente di temperatura nella zona congelata (G), due parametri fondamentali per la valutazione della dimensione dei cristalli di ghiaccio. Il programma, ricevute in input le immagini ottenute con la termocamera e la frequenza di campionamento, corregge gli effetti di distorsione ottica e mostra in tempo reale la posizione del massimo e i profili assiali di temperatura per tutti i flaconi, da cui è possibile ottenere una stima della temperatura al fondo e sulla superficie superiore del prodotto, nonché del massimo assoluto di temperatura in ogni immagine. Poiché il processo di congelamento è esotermico, il massimo di temperatura corrisponde all'interfaccia tra il prodotto completamente congelato e la soluzione di acqua e ghiaccio in cui l'accrescimento dei cristalli è ancora in corso. Noti questi tre valori di temperatura è infine possibile ottenere i gradienti di temperatura nella zona congelata (G) e la velocità di avanzamento dell'interfaccia di congelamento (R). Ciò rappresenta un aspetto innovativo in quanto finora questi due parametri sono stati ricavati attraverso l'applicazione di modelli matematici.

Dalla velocità di avanzamento del fronte di congelamento (R) e dal gradiente di temperatura (G) lungo l'altezza del prodotto è possibile stimare la dimensione dei cristalli e, in ultima analisi, la resistenza al trasporto di materia. A tale scopo, sono stati utilizzati due modelli, empirico (Nakagawa *et al.*, 2017) o meccanicistico (Arsiccio *et al.*, 2017). Sono state effettuate diverse prove per soluzioni di mannitolo al 5% in peso e di saccarosio al 5% e al 10% in peso, con lo scopo anche di confrontare due prodotti aventi rispettivamente comportamento cristallino e amorfo. Dall'analisi delle immagini termografiche ottenute da queste prove sono stati estratti R e G . Mediando i valori ottenuti tramite immagini termografiche per varie prove e diversi flaconi si è infine ricavato l'andamento di D_p medio lungo l'altezza di prodotto per ogni flacone.

Per convalidare i risultati ottenuti si sono effettuate delle prove complete della fase di essiccamento. Inoltre, questo ha consentito di poter analizzare la morfologia del prodotto secco al microscopio elettronico a scansione. Basandosi sulle immagini SEM dei prodotti liofilizzati per formulazioni al 5% e al 10% di saccarosio è stato possibile confrontare l'andamento sperimentale con quello ricavato tramite termografia. Considerando le incertezze legate alla determinazione della dimensione dei pori, il profilo sperimentale ha mostrato comunque un buon accordo rispetto a quello calcolato dalle analisi delle immagini termografiche.

In seguito, nota la distribuzione dimensionale è stato possibile valutare la resistenza al trasporto di materia (R_p). Il profilo di R_p è stato inserito in un modello dell'essiccamento primario, implementato in MATLAB R2017b, che consente la determinazione della durata dell'essiccamento primario t_d e della temperatura massima raggiunta T_{max} . È stato osservato che i valori sperimentali di t_d e T_{max} sono estremamente vicini a quelli calcolati dal modello. Tali valori sono di estrema importanza in quanto consentono la valutazione della fattibilità del processo e dello stress termico subito dal prodotto. Ciò è importante se si desidera ottimizzare il processo, riducendo al massimo i tempi ma senza indurre collasso della struttura.

In definitiva, dunque, il monitoraggio della fase di congelamento tramite termocamera potrebbe consentire l'ottimizzazione dell'intero ciclo di liofilizzazione.

Lista simboli

A	Coefficiente di interpolazione, s^{-1}
a_0	Coefficiente di interpolazione, μm
a_1	Coefficiente di interpolazione, $\mu\text{m mm}^{-1}$
A_v	Sezione del flacone, m^2
b	Fattore di forma, $\text{K}^{(2/3)} \text{m}^{(-2/3)}$
B	Coefficiente di interpolazione, mm^{-1}
C°	Contenuto di acqua all'equilibrio, kg m^{-3}
C_w	Concentrazione di umidità residua nel prodotto, kg m^{-3}
D_e	Diffusività di Knudsen, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
D_p	Diametro dei cristalli di ghiaccio, μm
$F_{sh,side}$	Fattore di vista tra flacone e ripiani
$F_{wall,side}$	Fattore di vista tra flacone e pareti liofilizzatore
G	Gradiente di temperatura nella zona congelata, $\text{K } \mu\text{m}^{-1}$
h	Coefficiente di scambio termico aria flacone, $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$
h_{side}	Coefficiente di scambio termico aria flacone, $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$
ΔH_f	Calore latente di solidificazione, J kg^{-1}
ΔH_s	Entalpia di sublimazione, J kg^{-1}
J_q	Flusso di calore, $\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1}$
J_w	Flusso sublimativo di vapore, $\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1}$
K	Costante dell'equazione 2.12, $\text{m s}^{-1} \text{K}^{-0.5}$
k_d	Costante di desorbimento, s^{-1}
k_{frozen}	Conducibilità termica del prodotto congelato, $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$
k_g	Conducibilità della parete di vetro del flacone, $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$
k_s	Conducibilità del prodotto congelato, $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$
K_v	Coefficiente globale di scambio termico, $\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{K}^{-1}$
l	Lunghezza dei pori, mm
L_{dried}	Spessore prodotto essiccato, mm
L_{frozen}	Spessore prodotto congelato, mm
m	Massa di acqua, kg
m_w	Massa di acqua presente all'interno di un flacone, kg
M_w	Massa molare acqua, kg mol^{-1}
n_p	Numero dei pori cilindrici
P_P/P_B	Rapporto tra la pressione misurata dal Pirani e quella misurata dal Baratron
p_{wc}	Pressione parziale del vapore in camera, Pa
p_{wi}	Tensione di vapore all'interfaccia di sublimazione, Pa
q_{side}	Flusso termico totale diretto verso la parete del flacone, W m^{-2}
$q_{side,conv}$	Flusso termico legato alla convezione, W m^{-2}
$q_{side,irr}$	Flusso termico legato all'irraggiamento, W m^{-2}
R	Velocità di avanzamento del fronte di congelamento, $\mu\text{m s}^{-1}$
R	Costante dei gas, $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
r_e	Raggio del prodotto secco, μm
R_g	Raggio interno dei flaconi di vetro, m
R_p	Resistenza al trasporto di materia, m s^{-1}
s_g	Spessore dei flaconi di vetro, m
T	Temperatura media del prodotto essiccato, $^\circ\text{C}$
t	Tempo, h
T_{air}	Temperatura aria esterna, K
T_b	Temperatura al fondo del flacone, $^\circ\text{C}$

t_{drying}	Tempo di essiccamento, h
T	Temperatura media del prodotto essiccato, K
T_f	Temperatura fluido refrigerante/riscaldante, K
T_g	Temperatura parete flacone di vetro, K
$T_{g,out}$	Temperatura della parete esterna del flacone, K
T_i	Temperatura all'interfaccia di sublimazione, °C
T_{max}	Temperatura massima raggiunta dal prodotto liofilizzato, °C
T_n	Temperatura di nucleazione, °C
T_p	Temperatura del prodotto, K
T_{sh}	Temperatura dei ripiani del liofilizzatore, K
T_w	Temperatura delle pareti del liofilizzatore, K
ΔT	Differenza di temperatura tra prodotto e aria, K
ΔT_m	Differenza di temperatura media tra fluido e prodotto, K
V_s	Volume del solido, m ³
Δz	Discretizzazione dello spessore di prodotto, mm

Lettere greche

α	Coefficiente di proporzionalità del modello empirico (1.5), $\mu\text{m s}^{-0.5} \text{K}^{0.5}$
α_g	Assorbanza del vetro
ε	Grado di vuoto, rapporto volume ghiaccio e volume totale del sistema
ε_g	Emissività del vetro
γ	Tensione interfacciale solido-solido, J m ⁻²
λ_1	Costante dell'equazione 1.5
λ_2	Costante dell'equazione 1.5
ρ	Riflettanza del vetro
ρ_{ice}	Densità del prodotto congelato, kg m ⁻³
ρ_s	Densità del solido, kg m ⁻³
σ_b	Costante di Stefan-Boltzmann, W m ⁻² K ⁻⁴
τ	Tortuosità
τ_g	Trasmittanza del vetro

Riferimenti bibliografici

- Arsiccio A., 2016, Sviluppo di un processo continuo per la liofilizzazione di prodotti farmaceutici. *Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili*, Politecnico di Torino.
- Arsiccio A., Barresi A.A. e Pisano R., 2017, Prediction of ice crystal size distribution after freezing of pharmaceutical solutions. *Cryst. Growth Des.*, **17**(9), 4573-4581.
- Arsiccio A., Sparavigna A.C., Pisano R. e Barresi A. A., Measuring and predicting pore size distribution of freeze-dried solutions. *Drying Technol.*, in stampa. [DOI: 10.1080/07373937.2018.1430042]
- Barresi A.A., Pisano R., Rasetto V., Fissore D. e Marchisio D.L., 2010, Model-based monitoring and control of industrial freeze-drying processes: effect of batch non-uniformity. *Drying Technol.*, **28**(5), 577-590.
- Bharati, M.H.; MacGregor, J.F., 2000, Texture analysis of images using Principal Component Analysis. *Proceeding of SPIE/Photonics Conference on Process Imaging for Automatic Control*, Boston, pp 27-37.
- Bhatnagar B.S., Pikal M.J. e Robin H.B., 2008, Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing. *J. Pharm. Sci.*, **97**(2), 798-814.
- Bomben J.L. e King C.J., 1982, Heat and mass transport in the freezing of apple tissue. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **17**(5), 615-632.
- Bosca S., Corbellini S., Barresi A. A. e Fissore D., 2013, Freeze-drying monitoring using a new process analytical technology: Toward a “zero defect” process. *Drying Technol.*, **31**(15), 1744–1755.
- Bursac R., Sever R. e Hunek B., 2009, A practical method for resolving the nucleation problem in lyophilization. *BioProcess Int.*, **7**(9), 66-72
- Daukas L.A. e Trappler E.H., 1998, Assessing the quality of lyophilized parenterals. *Pharm. Cosmetic Quality*, **2**(1), 21-25.
- Fissore D., 2013, Freeze drying of pharmaceuticals, in “*Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*”, (J. Swarbrick, Eds.), 4th edition, volume III. Taylor and Francis, New York, pp. 1723-1737.
- Fissore D., Coletto M.M. e Barresi A.A., 2013, Atmospheric food freeze-drying: challenges and opportunities. *New Food*, **16**(6), 11-14.
- Fissore D., Pisano R. e Barresi A.A., 2017, On the use of temperature measurement to monitor a freeze-drying cycle for pharmaceuticals. *Proceedings of IEEE International Instrumentation and Measurements Technology Conference (I2MTC), Torino, Italia, Maggio 22–25*, paper 17039633, 1276-1281.
- Fissore D., Pisano R. e Barresi A.A., 2018, Process analytical technology for monitoring pharmaceuticals freeze-drying – A comprehensive review. *Drying Technol.*, **36**(15), 1839-1865.
- Fissore D. e Pisano R., 2015, Computer-aided framework for the design of freeze-drying

- cycles: Optimization of the operating conditions of the primary drying stage. *Processes*, **3**(2), 406-421.
- Geidobler R., Konrad I. e Winter G., 2013, Can controlled ice nucleation improve freeze-drying of highly-concentrated protein formulations? *J. Pharm. Sci.*, **102**(11), 3915-3919.
- Geidobler R., Mannschedel S. e Winter G., 2012, A new approach to achieve controlled ice nucleation of supercooled solutions during the freezing step in freeze-drying. *J. Pharm. Sci.*, **101**(12), 4409-4413.
- Gonzalez R.C., Woods R.E. e Eddins S.L., 2004, Digital image processing using Matlab. *Pearson education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey*.
- Grassini S., Parvis M. e Barresi A.A., 2013, Inert thermocouple with nanometric thickness for lyophilization monitoring. *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, **62**(5), 1276–1283.
- Grassini S., Pisano R., Barresi A.A., Angelini E. e Parvis M., 2016, Frequency domain image analysis for the characterization of porous products. *Measurement*, **94**, 515–522.
- Hemteborg H., Zeleny R., Charoud-Got J., Martos G., Luddeke J., Schellin H. e Teipel K., 2014, Infrared thermography for monitoring of freeze-drying processes: Instrumental developments and preliminary results. *J. Pharm. Sci.*, **103**(7), 2088-2097.
- Hotelling, H., 1933, Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.*, **24**, 417–441, 498–520.
- Hottot A., Vessot S. e Andrieu J., 2007, Freeze-drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chem. Eng. Process. Process Intensification*, **46**(7), 666-674.
- Hsu C.C., Ward C.A., Pearlman R., Nguyen H.M., Yeung D.A. e Curley J.G., 1992, Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals. *Dev. Biol. Stand.*, **74**, pp. 255-271.
- Inada T., Zhang X., Yabe A. e Kozawa Y., 2001, Active control of phase change from supercooled water to ice by ultrasonic vibration, part 1: Control of freezing temperature. *Int. J. Heat Mass Transfer*, **44**(23), 4523-4531.
- Kasper J.C., Wiggenhorn M., Resch M. e Friess W., 2013, Implementation and evaluation of an optical fiber system as novel process monitoring tool during lyophilization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **83**(3), 449-459.
- Kasper J.C. e Friess W., 2011, The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **78**(2), 248-263.
- Kochs M., Korber C.H., Heschel I. e Nunner B., 1991, The influence of the freezing process on vapour transport during sublimation in vacuum freeze-drying. *Int. J. Heat Mass Transf.*, **34**(9), 2395-2408.
- Kramer M., Sennhenn B. e Lee G., 2002, Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing. *J. Pharm. Sci.*, **91**(2), 433-443.
- Kurz W. e Fisher D.J., 1992, *Fundamentals of Solidification*, Trans Tech Publications, Switzerland.
- Lietta E., 2018, Monitoraggio del processo di liofilizzazione con termocamera IR. *Tesi di*

Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili, Politecnico di Torino.

- Lietta E., Colucci D., Distefano G. e Fissore D., 2019, On the use of infrared thermography for monitoring a vial freeze-drying process. *J. Pharm. Sci.*, **108**(1), 391-398.
- Nail S., Tchessalov S., Shalaev E., Ganguly A., Renzi E., Dimarco F., Wegiel L., Ferris S., Kessler W., Pikal M. et al., 2017, Recommended best practices for process monitoring instrumentation in pharmaceutical freeze-drying—2017. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **18**(7), 2379-2393.
- Nakagawa K., Hottot A., Vessot S. e Andrieu J., 2007, Modeling of freezing step during freeze-drying of drugs in vials. *AIChE J.*, **53**(5), 1362-1372
- Napoletano F., 2016. Mathematical modeling of the freezing process for parenteral products, *Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili*, Politecnico di Torino.
- Oddone I., Barresi A.A. e Pisano R., 2017, Influence of controlled ice nucleation on the freeze-drying of pharmaceuticals products: The secondary drying step. *Int. J. Pharm.*, **524**(1-2), 134-140.
- Oddone I., Pisano R., Bullich R. e Stewart P., 2014, Vacuum-induced nucleation as method for freeze-drying cycle optimization. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **53**(47), 18236-18244.
- Oetjen G.W. e Haseley P., 2004, *Freeze-drying*, Wiley-VHC: Weinheim.
- Parvis M., Grassini S. e Barresi A.A., 2012, Sputtered thermocouple for lyophilization monitoring. *Proceedings of IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC), Graz, Austria, Maggio 13–16*, 1994-1998.
- Parvis M., Grassini S., Fulginiti D., Pisano R. e Barresi A.A., 2014, Sputtered thermocouple array for vial temperature mapping. *Proceedings of IEEE International Instrumentation and Measurements Technology Conference (I2MTC), Montevideo, Uruguay, Maggio 12–15*, 1465-1470.
- Patel S.M., Bhugra C. e Pikal M.J., 2009, Reduced pressure ice fog technique for controlled ice nucleation during freeze-drying. *AAPS PharmSciTech.*, **10**(4), 1406-1411.
- Patel S.M., Doen T. e Pikal M.J., 2010, Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. *AAPS PharmSciTech.*, **11**(1), 73-84.
- Pearson, K., 1901, On Lines and Planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.*, **2**(11), 559–572.
- Petersen A., Schneider H., Rau G. e Glasmacher B., 2006, A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature. *Cryobiology*, **53**(2), 248-257
- Pikal M.J., 1990a. Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *Biopharm.*, **3**(8), 18-27.
- Pikal M.J., 1990b. Freeze-drying of proteins. Part II: formulation selection. *Biopharm.*, **3**(9), 26-30.
- Pikal M.J., Shah S., Roy M.L., Putman R., 1990, The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm.*, **60**(3), 203-217.
- Pisano R., Barresi A.A., Capozzi L.C., Novajra G., Oddone I., Vitale-Brovarone C., 2017,

- Characterization of the mass transfer of lyophilized products based on X-ray micro-computed tomography images. *Drying Technol.*, **35**(8), 933-938.
- Pisano R. e Capozzi L.C., 2017, Prediction of product morphology of lyophilized drugs in the case of Vacuum Induced Surface Freezing. *Chem. Eng. Res. Des.*, **125**, 119-129.
- Prats-Montalbán J.M., De Juan A. e Ferrer, A., 2011, Multivariate image analysis: a review with applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **107**, 1-23.
- Presser I., 2003, Innovative online measurement procedures to optimize freeze-drying processes. *Ph.D. Thesis, University of Munich, Germany*.
- Rambhatla S., Ramot R., Bhugra C., Pikal M.J., 2004, Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. *AAPS PharmSciTech.*, **5**(4), 54-62.
- Schneid S. e Gieseler H., 2008, Evaluation of a new wireless temperature remote interrogation system (TEMPRIS) to measure product temperature during freeze-drying. *AAPS PharmSciTech.*, **9**(3), 729-739.
- Searles J., Carpenter J. e Randolph T., 2001a, The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.*, **90**(7), 860-871.
- Searles J., Carpenter J. e Randolph T., 2001b, Annealing to optimize the primary drying rate, reduced freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T_g' in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.*, **90**(7), 872-887.
- Van Bockstal P.J., Corver J., De Meyer L., Vervaeet C. e De Beer T., 2018, Thermal imaging as a noncontact inline process analytical tool for product temperature monitoring during continuous freeze-drying of unit doses, *Anal. Chem.*, **90**(22), 13591-13599.
- Weng L., Tessier S.N., Swei A., Stott S.L. e Toner M., 2017, Controlled ice nucleation using freeze-dried *Pseudomonas syringae* encapsulated in alginate beads. *Cryobiology*, **75**, 1-6.
- Willemer H., 1991, Measurement of temperature, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.*, **74**, 123-136.
- Zhang X., Inada T., Yabe A., Lu S. e Kozawa Y., 2001, Active control of phase change from supercooled water to ice by ultrasonic vibration, part 2: Generation of ice slurries and effect of bubble nuclei. *Int. J. Heat Mass Transfer*, **44**(23), 4533-4539.