

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

## **Liofilizzazione in continuo di farmaci in singole dosi**



**Relatore**

prof. Roberto Pisano

**Candidato**

Giuseppe Carrieri

Marzo 2020



# Indice

<b>CAPITOLO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
1.1 Liofilizzazione .....	2
1.1.1 Congelamento .....	4
1.1.2 Cristallizzazione .....	6
1.1.3 Fasi di congelamento .....	8
1.1.4 Metodi sul controllo della temperatura di nucleazione.....	10
1.1.5 Essiccamento primario.....	13
1.1.5 Essiccamento secondario.....	15
1.2 Impianti di Liofilizzazione .....	15
1.2.1 Liofilizzazione batch.....	16
1.2.2 Liofilizzazione continua a flaconi sospesi .....	17
1.2.3 Scambio di calore Batch Vs Flaconi Sospesi.....	18
1.3 Obiettivo tesi.....	20
<b>CAPITOLO II</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Materiali e metodi utilizzati per le analisi delle prove sperimentali</b> .....	<b>22</b>
2.1 Caratterizzazione termica .....	22
2.1.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) .....	22
2.1.2 Criomicroscopio (FDM) .....	24
2.2 Prove di congelamento .....	27
2.3 Prove di liofilizzazione.....	31
2.4 Analisi dell'attività biologica di LDH.....	35
2.5 Analisi del contenuto residuo d'acqua (Karl Fischer Titration).....	39
2.6 Analisi dello Scambio Termico Durante le Prove di Congelamento .....	41
2.7 Analisi della fase di essiccamento primario .....	47
<b>CAPITOLO III</b> .....	<b>51</b>
<b>3. Risultati</b> .....	<b>51</b>
3.1 Caratterizzazione termica via DSC .....	51
3.2 Caratterizzazione termica via FDM .....	54
3.3 Risultati relativi alla fase di essiccamento primario.....	56
3.3.1 Tempo di essiccamento e uniformità del lotto di produzione .....	56
3.3.2 Temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento .....	61
3.5 Analisi del contenuto residuo d'acqua .....	65
3.6 Analisi dell'attività biologica di LDH per le prove di congelamento .....	68

3.7	Analisi dello scambio termico durante la fase di congelamento .....	74
3.8	Analisi dell'attività biologica di LDH post liofilizzazione .....	81
<b>CAPITOLO IV .....</b>		<b>84</b>
<b>4. Conclusioni.....</b>		<b>84</b>
<b>Lista dei simboli.....</b>		<b>86</b>
<b>Abbreviazioni.....</b>		<b>88</b>
<b>Elenco Figure .....</b>		<b>90</b>
<b>Elenco Tabelle.....</b>		<b>93</b>
<b>Bibliografia .....</b>		<b>94</b>
<b>Ringraziamenti .....</b>		<b>98</b>



## 1. Introduzione

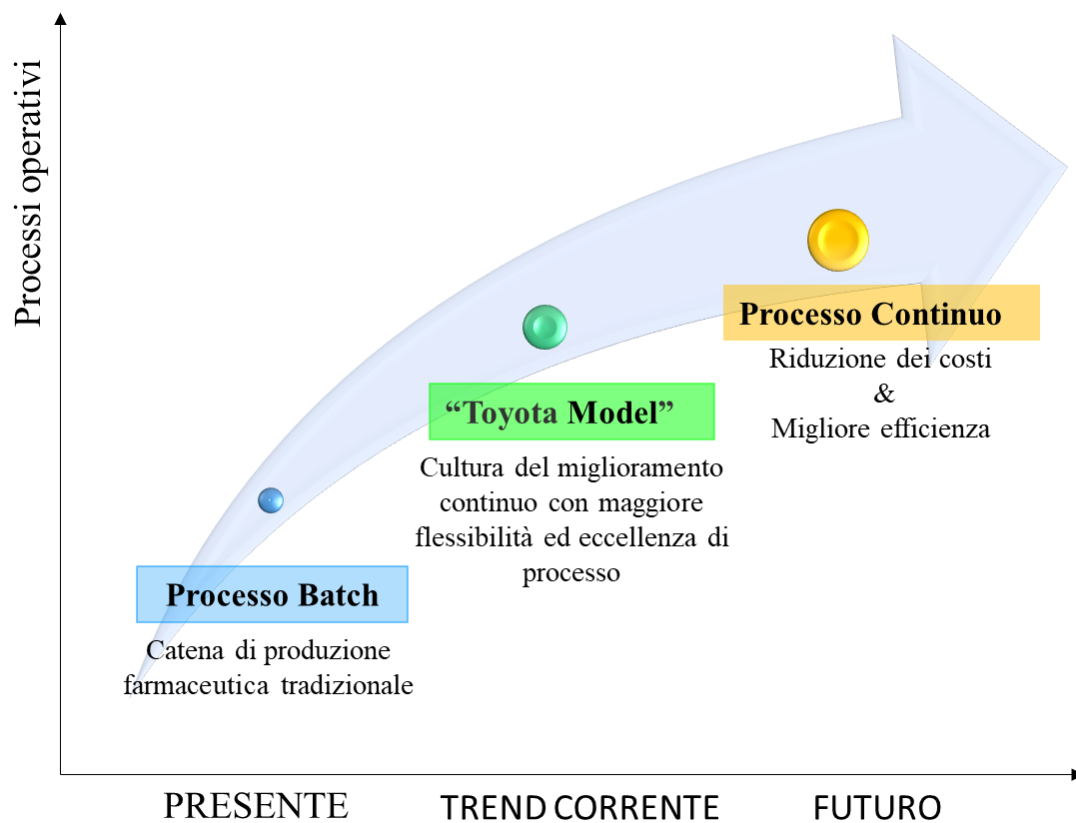
Il numero di biofarmaci in fase di sviluppo è aumentato in modo significativo negli ultimi anni. Questo aspetto è evidenziato dal fatto che la FDA (**Food and Drug Administration**, “Agenzia per gli alimenti e medicinali”) negli ultimi tre anni ha approvato annualmente oltre dieci nuovi prodotti biologici. I biofarmaci sono molecole proteiche complesse, prodotte in laboratorio all’interno di sistemi viventi (come le cellule), essi infatti sono costituiti da strutture molecolari quali aminoacidi, acidi nucleici, enzimi, ormoni ecc. Tali composti hanno fornito nuove possibilità e nuove metodiche per trattare con maggior efficacia importanti malattie come il cancro, il diabete, l’epatite, la sclerosi multipla e l’anemia.

Uno dei primi fattori di ricerca per le aziende farmaceutiche è stato quello di trovare una giusta formulazione che possa preservare più al lungo nel tempo l’attività biologica del biofarmaco. Naturalmente un metodo semplice ed economico per conservare un prodotto farmaceutico è quello in soluzione acquosa. Come detto però, un biofarmaco generalmente è costituito da proteine con complesse strutture molecolari; queste macromolecole risultano essere soggette a differenti stress di natura principalmente ambientale. Infatti molti complessi proteici sono suscettibili a fenomeni di: degradazione fisica e chimica (e.g., deaminazione o ossidazione), fenomeni d’agitazione e variazioni di temperatura. Tali stress sono particolarmente accentuati se il nostro prodotto biologico è mantenuto in soluzioni acquose soprattutto per lungo arco di tempo (Chang, et al., 1996)

Per superare questa “barriera d’instabilità”, generalmente molte proteine sono preservate in forma solida (anidra), per aumentarne la loro stabilità nel tempo. Uno dei metodi più utilizzati nel campo farmaceutico per ottenere prodotti biologici in forma solida e stabili nel tempo è la liofilizzazione (freeze-drying). Sfortunatamente, la liofilizzazione è un processo che comprende sia una fase di congelamento, sia una fase di essiccamento, le quali generano stress non indifferenti al prodotto proteico denaturandolo in vari gradi. Per tale motivo il campo della liofilizzazione di biofarmaci è un settore ancora in via di sviluppo e aperto alla ricerca di nuove tecnologie che possano preservare l’attività biologica dei farmaci e migliorarne la loro stabilità nel tempo (Wang, 2000).

Attualmente l’industria farmaceutica sta affrontando un periodo di cambiamenti significativi che comprendono nuovi farmaci, nuove forme di dosaggio e mercati molto competitivi con standard più rigorosi stabiliti dalle autorità di regolamentazione. Per rispondere a queste nuove sfide molte aziende hanno elevato il valore clinico ed economico dei loro prodotti introducendo tecnologie innovative e apportando anche delle importanti modifiche nelle strutture di produzione e di distribuzione (Gautam & Pan, 2016). In questa prospettiva la strategia adottata da alcune importanti compagnie è chiamata “Toyota model”, la quale consiste nel passare in maniera graduale da un processo tradizionale, ad un modello più produttivo, snello e manifatturiero. Il prossimo step prevede il passaggio da una produzione tradizionale in batch verso un processo di produzione di biofarmaci continuo (Figura 1.1).

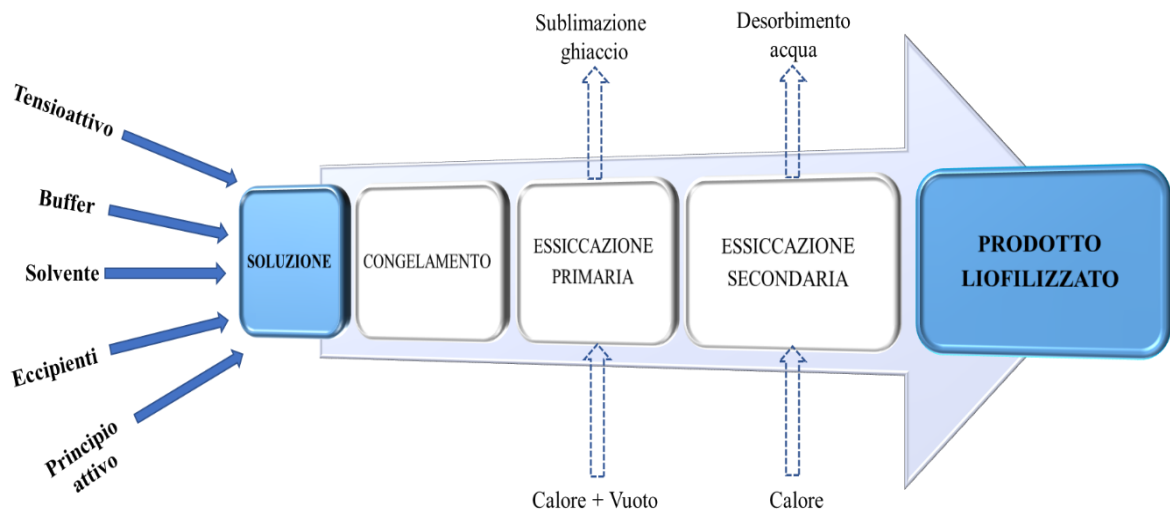
L’obiettivo di questa tesi consiste nell’analizzare due configurazioni di processo differenti, ponendo a confronto alcuni parametri del più tradizionale modello di liofilizzazione in batch con un modello a flaconi sospesi, il quale più di tutti si avvicina ad un approccio continuo.



*Figura 1.1- Presente & Futuro nel settore farmaceutico; Figura modificata da (Pisano, et al., 2019)*

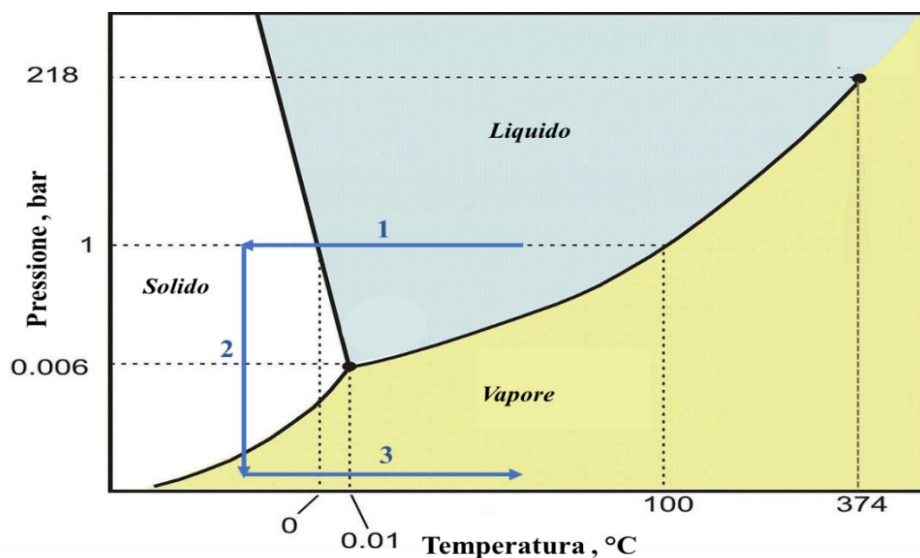
## 1.1 Liofilizzazione

La liofilizzazione, o in inglese freeze-drying, è un processo nel quale un solvente (tipicamente acqua) viene congelata e rimossa dal campione; inizialmente per sublimazione (primary drying) applicando calore più un certo grado di vuoto e successivamente mediante desorbimento (secondary drying), (si veda Figura 1.2). Tale processo è applicato generalmente su prodotti farmaceutici biologici termolabili o instabili in soluzione acquosa, che necessitano una conservazione per periodi prolungati. Il freeze-drying trova un ampio utilizzo sia in campo farmaceutico che in campo alimentare per sostanze biologiche e prodotti che “amano essere in stato solido” (“love the dry state”) (Nireesha, et al., 2013).



**Figura 1.2-** Schema generale di un processo di liofilizzazione

Un tipico processo di liofilizzazione, come si vede in Figura 1.3, è costituito da tre fasi: congelamento, essiccazione primaria e essiccazione secondaria. Durante la fase di congelamento (freccia 1 in Figura 1.3) la soluzione liquida viene raffreddata fino a che non avviene la nucleazione dei primi cristalli di ghiaccio, seguita da una fase di accrescimento. Durante la fase di essiccazione primaria (freccia 2 in Figura 1.3), l'acqua presente in forma di cristalli di ghiaccio viene rimossa mediante sublimazione. Per realizzare questo step la pressione in camera di liofilizzazione viene ridotta al di sotto della pressione di vapore del ghiaccio e successivamente la temperatura del ripiano viene aumentata gradualmente per sopperire alla rimozione di calore causata dal processo di sublimazione del ghiaccio. L'ultima fase è costituita dall'essiccazione secondaria (freccia 3 in Figura 1.3) dove avviene la rimozione dal prodotto della rimanente quantità d'acqua (circa il 10% -15%) non congelata durante la fase di congelamento. Tale rimozione avviene mediante desorbimento ad elevate temperature e mantenendo una bassa pressione in camera, per ottenere un valore finale desiderato d'umidità residua all'interno del prodotto liofilizzato.



**Figura 1.3-** Diagramma di fase dell'acqua con illustrato il percorso delle tre fasi della liofilizzazione



### 1.1.1 Congelamento

Generalmente per ottimizzare e sviluppare il processo di liofilizzazione si pone l'attenzione su quello che è la fase che richiede la maggiore quantità di tempo ovvero, l'essiccamento primario. Infatti le fasi di congelamento e essiccamento secondario sono relativamente brevi (poche ore), rispetto lo step di essiccamento primario che può avere un decorso anche di giorni.

Sebbene il congelamento non risulti essere la fase di maggior durata del processo, assume ugualmente un ruolo di fondamentale importanza, costituendo lo stadio dove avviene la maggior parte della disidratazione del prodotto liofilizzato. Questa fase infatti, influisce sulla microstruttura porosa del campione essiccato e su parametri importanti di processo come la durata dei tempi di essiccazione primaria e secondaria. Inoltre il congelamento costituisce lo stadio più critico per quanto riguarda l'attività biologica e la stabilità delle macromolecole di un prodotto farmaceutico, specialmente per le proteine che proprio in questa fase subiscono la maggior parte degli stress (Kasper & Friess, 2011).

La temperatura del ripiano durante il congelamento viene diminuita linearmente, con una velocità avente generalmente un range tra 0.1 °C/min e 5 °C/min. Utilizzando una velocità di raffreddamento elevata (pari ad esempio 3°C/min) si ottengono matrici con una grande area superficiale aventi un numero di cristalli elevato di piccole dimensioni. Questo andrà ad influenzare diversi parametri del processo, quale ad esempio il tempo di essiccamento primario che è in funzione della distribuzione dimensionale dei cristalli; i quali durante il fenomeno di sublimazione si trasformeranno in pori aventi misure simili. Invece basse velocità di congelamento (pari ad esempio 1 °C/min) danno origine a una matrice avente un'area superficiale limitata in quanto il numero di cristalli è inferiore e la loro dimensione maggiore. Rispetto al caso precedente, durante la fase di essiccamento primario si generano pori di dimensioni maggiori che facilitano il trasferimento di materia, riducendo i tempi di sublimazione e agevolando così l'essiccazione del prodotto (Franks & Auffret, 2007). Il tutto può essere riassunto e illustrato mediante la Tabella 1.1.

**Tabella 1.1-** Effetto delle velocità di congelamento su alcuni parametri di processo

<i>Velocità di congelamento</i>	<i>Numero cristalli di ghiaccio</i>	<i>Dimensioni cristalli di ghiaccio</i>	<i>Tempo di sublimazione</i>
Basse	Pochi	Grandi	Breve
Alte	Molti	Piccoli	Lungo

La maggior parte dei prodotti che vengono sottoposti al processo di liofilizzazione sono costituiti da una soluzione in cui generalmente si ha come solvente l'acqua e come soluti sostanze che sono disciolti o sospesi in essa. Quindi i prodotti farmaceutici possono congelare tipicamente in due diverse modalità a seconda dei soluti che compongono la soluzione.

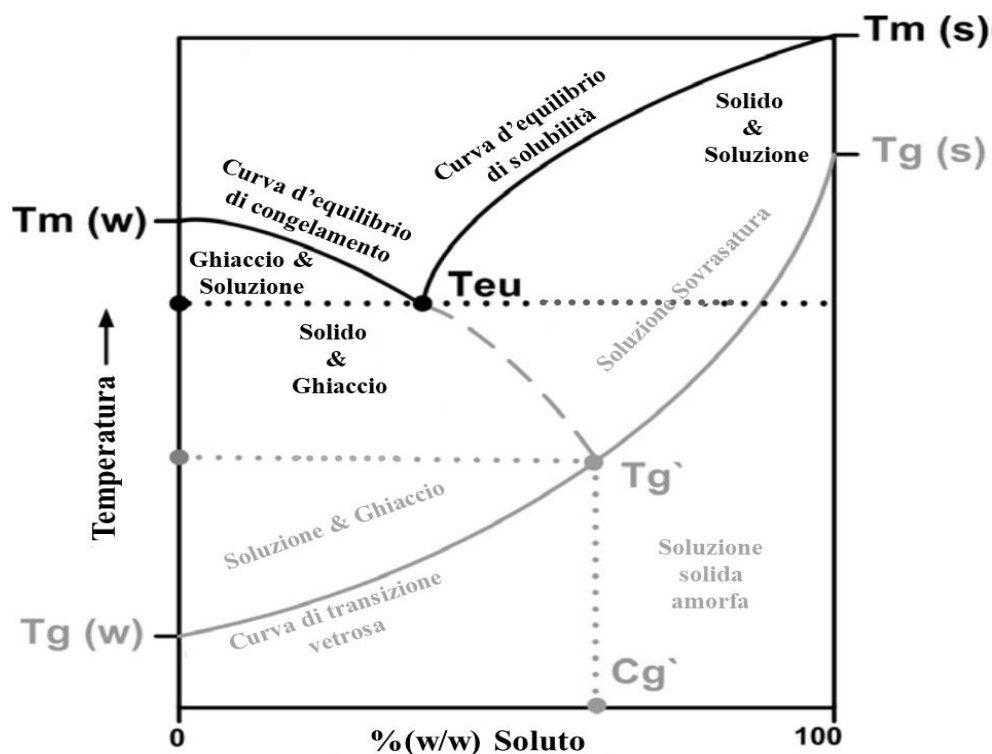
Se i soluti in forma solida sono di natura cristallina la temperatura da raggiungere affinché ci sia il completo congelamento della soluzione deve essere inferiore rispetto alla “Temperatura eutettica” ( $T_{eu}$ ). I composti eutettici sono miscele di sostanze che congelano ad una temperatura inferiore rispetto ad una soluzione d’acqua pura. Durante la fase di raffreddamento la temperatura del ripiano decresce linearmente, l’acqua si trasforma gradualmente in ghiaccio si separa dal soluto che aumenta la sua concentrazione in diverse aeree. Soltanto quando quest’ultimo congela del tutto, il prodotto può essere ritenuto completamente solidificato. Tale fenomeno è assicurato solo se la temperatura della soluzione è inferiore rispetto alla temperatura eutettica. Quindi risulta molto importante congelare il campione al di sotto di questa temperatura prima di iniziare la fase di essiccamento primario, in quanto piccole quantità di soluto non congelato possono compromettere la stabilità strutturale del prodotto finito (Rey & Rey, 2010).

Se i soluti in soluzione presentano una struttura amorfa in fase solida la temperatura alla quale bisogna portare il prodotto affinché l’intera soluzione congeli prende il nome di “temperatura di transizione vetrosa”, indicata anche come  $T_g$ . In questo caso al decrescere della temperatura del prodotto in fase di raffreddamento la soluzione diventa progressivamente più viscosa fino a che, una volta al di sotto della  $T_g$ , non avviene l’intera solidificazione del prodotto in una struttura solida amorfa (Kasper & Friess, 2011).

In Figura 1.4 è rappresentato il diagramma di stato per un sistema acqua/soluto. La curva d’equilibrio di congelamento rappresenta come la composizione di una soluzione concentrata cambi al diminuire della temperatura, in quanto vi è la trasformazione di una certa quantità d’acqua in ghiaccio. Si può osservare come la curva di congelamento interseca la curva di solubilità in un punto, quest’ultimo rappresenta la più bassa condizione termica in cui il soluto rimane in forma liquida e prende il nome appunto di “temperatura eutettica” ( $T_{eu}$ ). Al di sotto della  $T_{eu}$  abbiamo un sistema completamente solidificato composto da ghiaccio puro in equilibrio con una miscela solida d’acqua e soluto.

Invece per tutte le soluzioni composte da sostanze in cui la cristallizzazione è inibita, deve essere presa in esame la curva di transizione vetrosa. Quest’ultima intersecandosi sempre con la curva di congelamento definisce quella che è la  $T_g$ . Al di sotto di questa temperatura avviene il fenomeno che prende il nome di vetrificazione, che come già detto consiste nella trasformazione dell’intera soluzione in un composto solido e amorfo (Liu, 2006)

Entrambe le temperature  $T_{eu}$  e  $T_g$  possono essere visualizzate in Figura 1.4.



*Figura 1.4- Diagramma di stato acqua /soluto modificata da (Kasper & Friess, 2011)*

Il prodotto ottenuto dopo un processo di vetrificazione è decisamente differente al livello strutturale rispetto a un prodotto eutettico cristallizzato. Nel primo caso il campione è costituito da una matrice di cristalli di ghiaccio dove in zone interstiziali troviamo una soluzione solida e amorfa formata d'acqua non del tutto congelata e soluto. Nel secondo caso la regione interstiziale della matrice è costituita da una miscela di piccoli cristalli di ghiaccio e soluto. Pertanto, in un materiale cristallino, quasi tutta l'acqua è congelata e viene rimossa quasi completamente durante la fase di essiccazione primaria. Invece in un composto amorfo circa il 20% dell'acqua rimane in forma liquida associata ad una soluzione solida. Tale quantità viene rimossa quasi completamente nella fase di essiccazione secondaria dove avviene il processo di desorbimento (Feroz & Susan, 2010)

## 1.1.2 Cristallizzazione

La cristallizzazione costituisce sicuramente il fenomeno di maggior rilevanza durante il processo di congelamento di una soluzione farmaceutica. Essa è caratterizzata da due stadi fondamentali, quali la nucleazione e la successiva fase di crescita dei cristalli di ghiaccio. L'interazione di questi due step e la loro velocità, determinano alcune delle caratteristiche principali del sistema, come la morfologia, la dimensione e la distribuzione dei nuclei all'interno della matrice cristallina. Lo stadio di nucleazione consiste nella formazione in soluzione dei primi nuclei cristallini (nucleazione primaria), o nella generazione di questi ultimi in una miscela in cui sono già presenti cristalli di ghiaccio (nucleazione secondaria). La nucleazione primaria può essere omogenea se in soluzione non sono contenute né particelle estranee, né cristalli o in caso contrario eterogenea se vi è la presenza di superfici solide nel sistema. La differenza fra le due risiede nella forza motrice di congelamento che nel caso omogeneo risulta essere più grande rispetto a quello eterogeneo, in cui il fenomeno di

nucleazione è facilitato al livello energetico dalla presenza di superfici solide che fungono da sito di generazione di nuovi nuclei (Petzold & Aguilera, 2009).

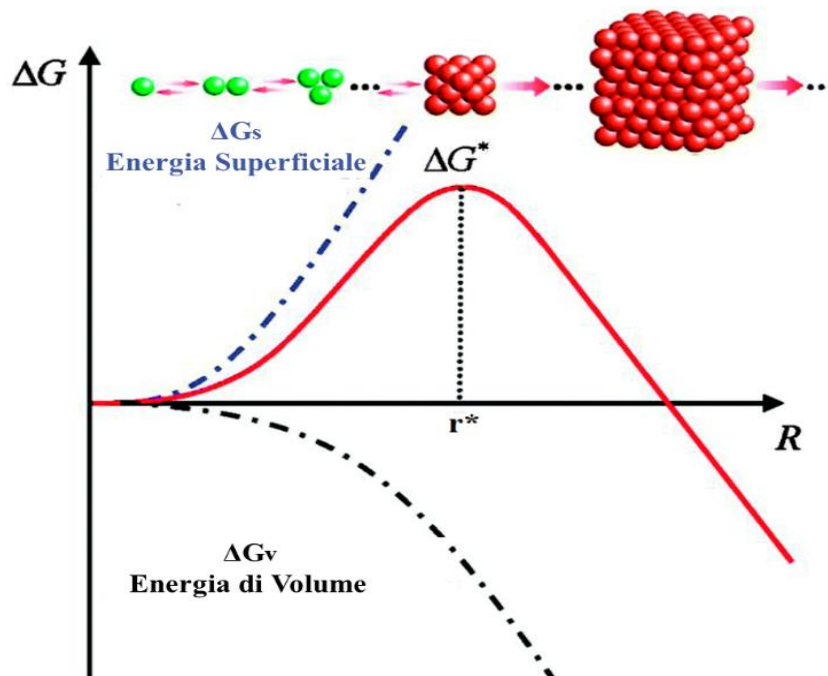
Il processo di nucleazione dal punto di vista termodinamico può essere spiegato definendo l'energia libera di Gibbs ( $\Delta G$ ) necessaria affinché si possano generare dei nuclei cristallini in soluzione. Tale quantità è definita come somma di due contributi. Il primo termine rappresenta una energia superficiale ( $\Delta G_s$ ), un contributo di lavoro positivo necessario affinché possa avvenire l'adeguata predisposizione delle molecole in soluzione per creare una nuova superficie. Il secondo termine è un'energia "di volume" che rappresenta un processo esotermico quindi una quantità di lavoro negativo.

I due contributi hanno un effetto contrastante su quella che è l'energia libera totale che un determinato sistema deve raggiungere affinché possa avvenire il fenomeno di nucleazione. Il termine superficiale ha un contributo positivo, quindi tende ad accrescere l'energia libera totale di Gibbs. Mentre il termine di volume costituisce un contributo negativo e tende quindi a diminuire tale quantità e a favorire termodinamicamente parlando il fenomeno di nucleazione.

Nell' Equazione 1.1 viene rappresentata l'energia libera di Gibbs come somma dei due contributi, il primo superficiale ( $\Delta G_s$ ) e il secondo di volume ( $\Delta G_v$ ).

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v \quad (1.1)$$

In Figura 1.5 è illustrata l'energia libera di Gibbs in funzione del raggio particellare.



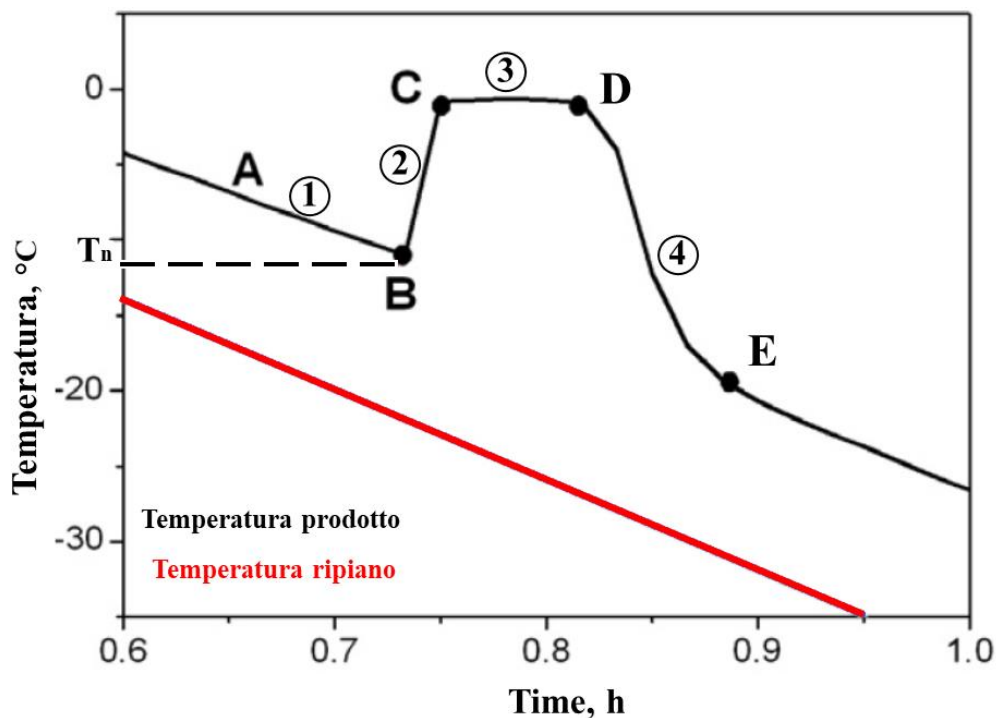
**Figura 1.5-** Profilo dell'energia libera di Gibbs in funzione del raggio particellare (figura adattata con modifiche da (Zhang & Xiang, 2014))

In Figura 1.5 viene rappresentata con il termine  $\Delta G^*$ , la barriera energetica necessaria da superare per far sì che avvenga nel nostro sistema il processo di nucleazione. Tale valore energetico è associato ad un valore di raggio, definito come raggio critico particellare  $r^*$  (Zhang & Xiang, 2014)

### 1.1.3 Fasi di congelamento

Durante la fase di raffreddamento una volta che il nostro prodotto è sceso al di sotto della sua temperatura d'equilibrio di congelamento, avviene un processo di aggregazione molecolare con la formazione di particelle che prendono il nome di cluster. Per tutti gli aggregati molecolari aventi raggio maggiore rispetto alla dimensione critica particellare  $r^*$ , il processo di nucleazione prende forma con la generazione e la successiva fase di accrescimento dei nuclei cristallini. Per tutti i cluster con raggio medio inferiore rispetto al raggio critico  $r^*$ , la nucleazione non prende luogo in quanto il loro livello energetico risulta essere inferiore rispetto al valore d'energia libera critica ( $\Delta G^*$ ) richiesta (Kiani & Sun, 2011).

In Figura 1.6 viene rappresentato un tipico profilo di temperatura di un prodotto farmaceutico durante la fase di congelamento.



*Figura 1.6- Profilo di temperatura prodotto farmaceutico durante la fase di congelamento. Figura adattata da (Kasper & Friess, 2011)*

Come si può vedere in Figura 1.6 sono identificati quattro step caratteristici che possono descrivere una generica fase di congelamento di un prodotto farmaceutico.

Il primo step consiste nella fase di sotto-raffreddamento identificata dalla curva (A-B). In questo tratto di curva il prodotto viene raffreddato ben al di sotto della temperatura di  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in quanto come detto una soluzione liquida congela ben al di sotto della temperatura di equilibrio di congelamento dell'acqua. Una volta al di sotto di tale temperatura inizia il processo di aggregazione delle prime molecole d'acqua, a causa delle oscillazioni di densità legate al moto Browniano, con la formazione dei primi cluster (Franks & Auffret, 2007). Fra questi aggregati molecolari, una volta raggiunta la temperatura di nucleazione ( $T_n$ ), si induce il processo di nucleazione soltanto in coloro "energeticamente stabili", ovvero aventi dimensione maggiore del raggio critico particellare ( $r^*$ ).

Il numero dei nuclei che partecipano al processo di nucleazione, la loro dimensione e morfologia, dipende dal gradiente di sotto-raffreddamento. Il quale viene definito come la differenza tra la temperatura d'equilibrio di congelamento pari a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e la temperatura alla quale avviene la prima formazione di nuclei cristallini pari alla temperatura di nucleazione  $T_n$  (rappresentata in figura 1.5) (Kasper & Friess, 2011). Ad esempio, in tutte quelle soluzioni aventi un grado di sotto-raffreddamento maggiore e dunque una temperatura di nucleazione ( $T_n$ ) minore, il numero di cluster che partecipano al processo di nucleazione risulterà essere maggiore. Questo perché in soluzioni aventi temperature di nucleazione minori, il numero di aggregati molecolari stabili energeticamente risulta essere maggiore statisticamente. In tal caso il numero dei nuclei cristallini in soluzione sarà elevato (Kiani & Sun, 2011).

Il secondo step consiste nella fase di nucleazione identificata dalla curva (B-C) in Figura 1.6. Come già affrontato, essa costituisce il processo che porta alla formazione di cristalli di ghiaccio in soluzione acquosa. La nucleazione può essere primaria o secondaria e omogenea o eterogenea in base alla modalità con cui viene indotta. La nucleazione è un processo esotermico quasi istantaneo che porta ad un innalzamento della temperatura di tutto il sistema (punto C, in figura 1.5).

La temperatura di nucleazione  $T_n$  (punto B, in figura 1.5) influenza il numero di cristalli e quindi la superficie acqua/ghiaccio che si genera nel nostro sistema durante l'intero processo di congelamento. Tale fenomeno costituisce un elemento importante per i composti farmaceutici contenenti principi attivi come le proteine, la quale stabilità risulta essere influenzata dalla superficie acqua/ghiaccio con cui esse si interfacciano durante il processo di congelamento (Wang, 2000).

Il terzo step (curva C-D), successivo al processo di nucleazione, rappresenta la fase di accrescimento dei nuclei cristallini. Le teorie utilizzate per descrivere tale processo includono concetti di energia superficiale, strato di adsorbimento e di diffusione molecolare. Quest'ultimo ipotizza che la velocità di accrescimento dei nuclei cristallini sia legata ad una differenza di concentrazione che si crea tra le superfici solide e il "bulk" della soluzione. Per tutta questa fase la temperatura del prodotto rimane pressoché costante.

Nel quarto ed ultimo step (curva D-E), finita la fase di accrescimento, la soluzione risulta essere completamente congelata e la sua temperatura decresce linearmente seguendo l'andamento termico della temperatura del ripiano.

## 1.1.4 Metodi sul controllo della temperatura di nucleazione

Come detto nei capitoli precedenti la modalità con cui un campione viene congelato influenza diversi parametri: la dimensione e la morfologia dei cristalli di ghiaccio, l'area superficiale della matrice cristallina, i tempi di essiccazione primaria e il quantitativo di umidità residua all'interno del nostro prodotto finale. Oltre a queste caratteristiche, il processo di congelamento ha un ruolo importante sull'omogeneità di tutti i prodotti che compongono l'intero batch. Tale parametro risulta di fondamentale rilievo nel campo di produzione sia farmaceutica che alimentare. La non uniformità di un batch di prodotti liofilizzati è conseguenza del fatto che la nucleazione è un fenomeno di natura stocastico, ovvero non avviene in tutti i flaconi nello stesso istante di tempo. L'eterogeneità, tra i vari flaconi, provoca delle differenze su diversi parametri quali ad esempio, la stabilità proteica, il residuo d'umidità e il tempo di sublimazione durante l'essiccamento primario (Kasper & Friess, 2011)

Per questo motivo si cercato di controllare attraverso varie tecniche il processo di nucleazione con l'obiettivo di indurre tale fenomeno all'incirca nello stesso istante per ogni flacone, migliorando così l'omogeneità complessiva dell'intero batch. Tra queste tecniche, in grado di controllare e indurre il processo di nucleazione ad una specifica temperatura, le più riconosciute sono: la nucleazione indotta per "ice-fog", la tecnica di "electrofreezing", il processo di induzione superficiale attraverso un grado di vuoto (VISF, vacuum-induced surface), la tecnica di Depressurizzazione e infine l'induzione attraverso l'aggiunta di agenti di reazione.

Tali procedure sono citate in questo paragrafo ponendo una particolare attenzione sulla tecnica VISF ("vacuum-induced surface").

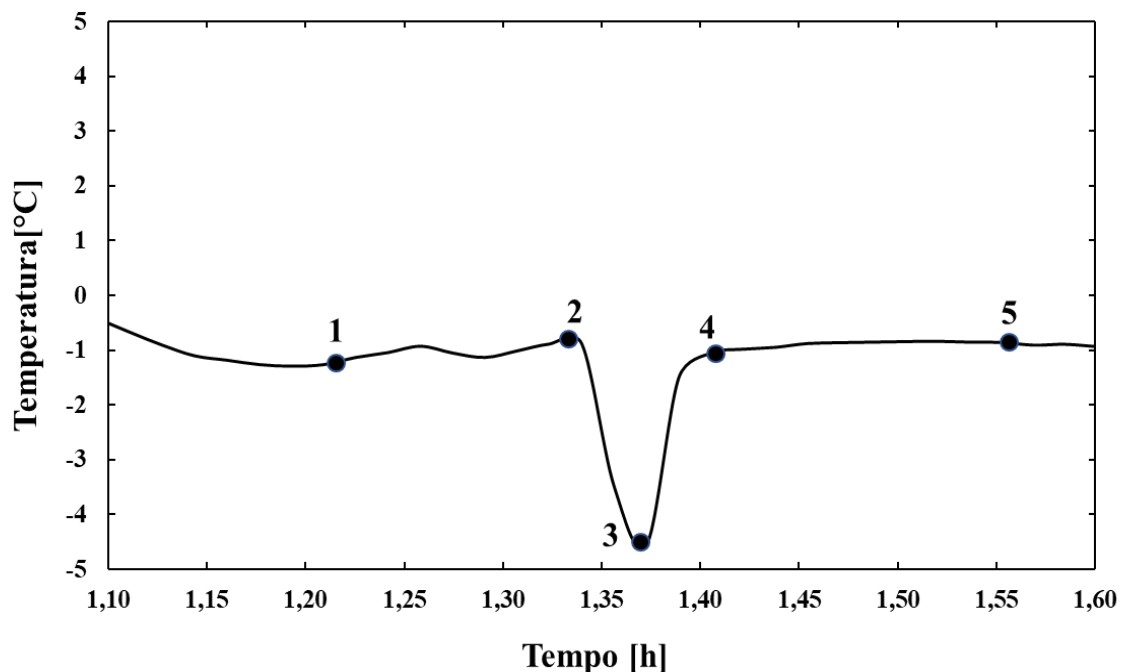
- VISF - ("vacuum-induced surface")

La tecnica VISF meglio conosciuta in inglese come "vacuum-induced surface" è un nuovo metodo utilizzato durante il processo di congelamento, capace di migliorare quelle che sono le caratteristiche di omogeneità del nostro batch e contemporaneamente di controllare la temperatura nucleazione.

Il metodo consiste di ridurre la pressione all'interno della camera ad una temperatura desiderata durante la fase di congelamento. Tale riduzione di pressione provoca la parziale evaporazione in superficie dell'acqua che causa un abbassamento di temperatura nelle soluzioni e promuove così il fenomeno di nucleazione. Un fattore importante della procedura consiste nel fatto che il processo di nucleazione dei nostri campioni deve essere indotto soltanto dall'abbassamento di pressione e non da promotori esterni quali particelle solide. Così facendo utilizzando la VISF si riesce a controllare con adeguata precisione la temperatura di nucleazione dei nostri prodotti. Sfortunatamente, uno dei principali problemi di questa procedura risiede nel fenomeno di "blow-up", ovvero la formazione di bolle all'interno del nostro prodotto congelato durante la fase di vuoto. Questo possibile avvenimento provoca dei difetti strutturali sulla forma finale della torta del prodotto liofilizzato, rendendolo di poca eleganza e non accettato dall'aziende farmaceutiche (Kramer, et al., 2002). Da studi più recenti, si è avviato il problema del "blow-up" durante la procedura VISF garantendo così una migliore struttura e evitando difetti di forma. In particolare si è apportata una modifica su quella che è la procedura tradizionale che caratterizza tale metodo. Tale miglioria prevede che durante la fase di vuoto, una volta raggiunta la pressione desiderata da permettere la nucleazione, venga isolata la camera di liofilizzazione dalla connessione con il condensatore e con la pompa da vuoto. La fase di "isolamento", di

circa un minuto, permette una crescita minima della pressione in camera dovuta al fenomeno di evaporazione e riduce drasticamente un eventuale “blow-up” nei prodotti (Oddone, et al., 2014).

In Figura 1.7 viene rappresentato un classico profilo termico di congelamento di una soluzione acquosa, attraverso utilizzo della tecnica VISF.



**Figura 1.7-** Profilo termico di congelamento di una soluzione 10 (mM) di buffer citrato a Ph 6.5 con 5% in peso di saccarosio con applicazione VISF per il controllo della temperatura di nucleazione a -5 °C.

Una classica procedura VISF per il controllo della temperatura di nucleazione può essere divisa in quattro step principali. Il primo step è rappresentato in Figura 1.7 dal tratto di curva (1-2), in cui si pone come obiettivo quello di mantenere costante per un certo periodo di tempo (circa 30 min) la temperatura del prodotto, alla quale si vuole indurre il fenomeno di nucleazione. Una volta raggiunta la temperatura desiderata si procede con l'applicazione del vuoto e la riduzione in camera della pressione fino a un valore necessario per indurre l'evaporazione dell'acqua sullo strato superficiale della soluzione. L'effetto dell'evaporazione dell'acqua genera un abbassamento di temperatura che può essere osservato nel tratto di curva (2-3). Tale fenomeno induce il processo di nucleazione che essendo un evento esotermico libera calore e riporta la temperatura del prodotto pressoché vicino a 0 °C (tratto curva 3-4). Il tempo di mantenimento del vuoto in camera alla pressione desiderata deve essere adeguato a garantire la nucleazione di tutti prodotti e evitare fenomeni quali “boiling”. Successivamente la camera viene riportata a pressione ambiente e si procede con l'ultimo step rappresentato dal tratto di curva (4-5), in cui si mantiene costante la temperatura del ripiano a un dato valore. Tale fase ha una durata di circa un'ora e ha come obiettivo quello di promuovere l'accrescimento di cristalli con una determinata caratteristica dimensionale (Oddone, et al., 2014).

Controllare la temperatura di nucleazione ha un effetto importante su diversi parametri come, la dimensione la morfologia e il numero di nuclei cristallini che si formano durante il processo.



Una bassa temperatura di nucleazione promuove la formazione di molti cristalli di ghiaccio con una dimensione ridotta. Al contrario, un'alta temperatura di nucleazione genera un minor numero di cristalli con una dimensione maggiore e dunque una matrice con area specifica superficiale minore. Quindi diverse temperature di nucleazione generano delle differenze in molteplici parametri strutturali che comportano anche delle variazioni su valori di stabilità proteica nei prodotti contenenti principi attivi, come LDH (lactate dehydrogenase) (Fang, et al., 2018).

Un ulteriore vantaggio riscontrato con l'utilizzo della tecnica VISF consiste nel migliore l'omogeneità di un processo di liofilizzazione batch rispetto alla più classica procedura, conosciuta come "shelf-ramped", che prevede una nucleazione spontanea dei prodotti durante la fase di congelamento.

Infatti con l'impegno di tale tecnica vi è un netto miglioramento di quelli che sono i valori quali tempo di sublimazione e differenza tra off-set e on-set durante la fase di essiccamento primario. L'abbassamento dell'ultimo parametro, indice di uniformità tra prodotti in un batch, è uno dei maggiori vantaggi che si riscontra utilizzando la VISF (Oddone, et al., 2016).

- "Ice Fog Technique"

Una altra tecnica utilizzata per il controllo della temperatura di nucleazione durante la fase di congelamento prende il nome di "*Ice fog technique*". Quest'ultima consiste nel rilasciare un flusso d'azoto freddo all'interno della camera di liofilizzazione, una volta raggiunta la temperatura desiderata di nucleazione dei prodotti. L'alto valore d'umidità presente nella camera insieme al flusso freddo d'azoto genera una sospensione di particelle di ghiaccio, fenomeno meglio conosciuto come "ice-fog" (Kasper & Friess, 2011). Le particelle di ghiaccio penetrano nei flaconi, si posano sullo strato superficiale della soluzione e fungono da sito di nucleazione. Uno dei problemi principali di tale tecnica risiede nel fatto che tali particelle di ghiaccio non raggiungono simultaneamente ogni flacone, creando così delle eterogeneità tra i prodotti finali. Per questo motivo sono state apportate delle modifiche al metodo che prevedono la riduzione in camera della pressione, tale da permettere un congelamento più veloce e uniforme. Questa modifica permette di ottenere un processo di nucleazione rapido, di circa un minuto, con la generazione di cristalli di ghiaccio di struttura uniforme in tutti i campioni (Patel, et al., 2009).

- "Electrofreezing"

Un altro metodo che prevede il controllo della temperatura di nucleazione prende il nome di "electrofreezing". Con tale tecnica si induce la nucleazione nei prodotti, ad una temperatura desiderata, attraverso l'applicazione di un campo elettrico esterno. La procedura consiste nell'applicazione di un alto voltaggio con l'obiettivo di generare nuclei cristallini su un elettrodo di platino. Successivamente all'induzione del processo di nucleazione i provini vengono immediatamente raffreddati. Applicazione di un campo elettrico uniforme ha riportato risultati benefici permettendo la formazione di nuclei cristallini con struttura omogenea e garantendo l'induzione dei processi di nucleazione anche ad alte temperature. Un ulteriore vantaggio di tale metodo consiste nel poter generare cristalli di ghiaccio senza l'utilizzo di sostanze esterne in soluzione (Kasper & Friess, 2011).

- “Tecnica di Depressurizzazione”

Il metodo di depressurizzazione per il controllo della temperatura nucleazione consiste in diversi step. La prima fase prevede l'immissione di aria in camera di liofilizzazione insieme ad un gas pressurizzante come argon o azoto. La camera viene pressurizzata ad un valore di pressione massimale di 3.5 bar. Una volta che il prodotto raggiunge la temperatura di nucleazione desiderata, la camera viene depressurizzata velocemente o lentamente. La variazione di pressione genera il cambiamento di fase con la formazione di nuclei cristallini in soluzione. Dopo la nucleazione i campioni vengono raffreddati velocemente attraverso scambio termico con il ripiano, fino alla loro temperatura di congelamento finale. Il risultato di tale tecnica consiste nella riduzione dei tempi di transizione di fase che ha come conseguenza una distribuzione omogenea dei cristalli di ghiaccio (Otero & Sanz, 2000).

- “Tecnica di addizione di agenti di nucleazione”

Attraverso la tecnica di addizione di agenti di nucleazione (“INAs”) si riesce a promuovere il processo di nucleazione attraverso meccanismo eterogeneo. Uno degli agenti di nucleazioni più studiati è lo ioduro d'argento (AgI). Con utilizzo dell'ioduro d'argento non si riesce ad ottenere un alto valore di omogeneità fra i prodotti del batch ma in compenso si riesce a svolgere il processo di nucleazione dei campioni anche ad alte temperature.

## 1.1.5 Essiccamento primario

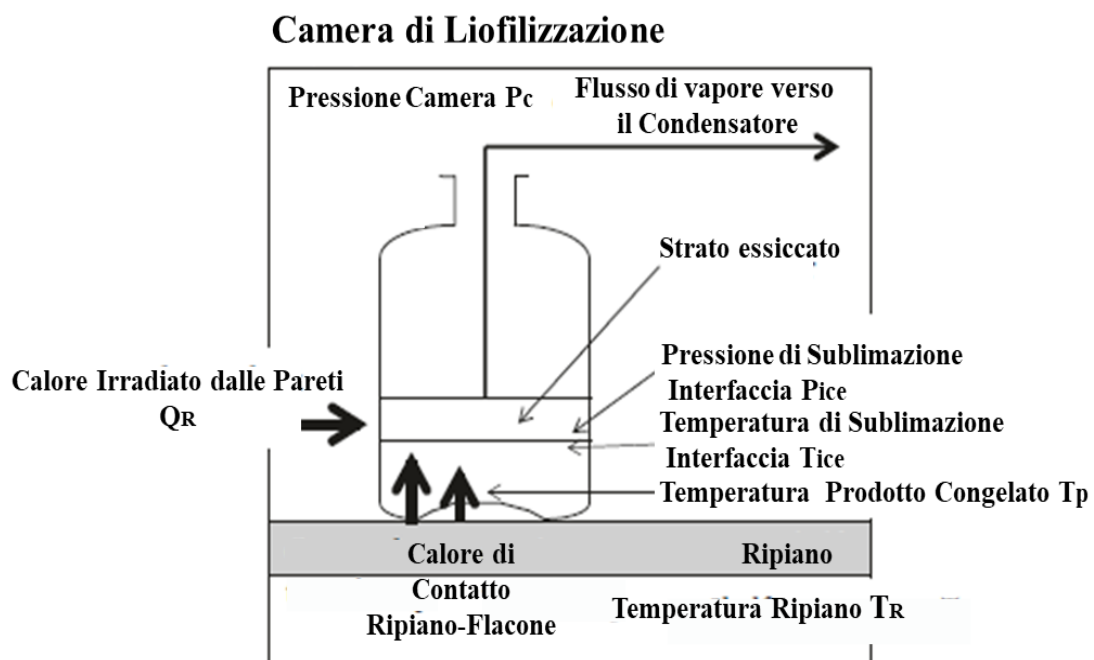
Una volta terminata la fase di congelamento inizia lo step di essiccamento primario, dove attraverso il fenomeno di sublimazione del ghiaccio in vapore acqueo viene rimossa la maggior parte della quantità d'acqua presente nei campioni (circa il 90% del totale). Il processo di essiccamento primario consiste nel ridurre la pressione in camera e successivamente nell'aumentare la temperatura del ripiano. La pressione in camera viene ridotta ad un valore inferiore rispetto a quella che è la tensione di vapore dell'acqua, in maniera tale da permettere la sublimazione del ghiaccio in vapore acqueo. Successivamente il vapore condensa e congela sulle pareti del condensatore, in quanto aventi una temperatura inferiore (Figura 1.8). Un valore tipico di pressione durante la fase di essiccamento primario è in un intervallo fra 5 e 40 Pa (Khairnar, et al., 2013). Bisogna tenere presente che valori bassi di pressione favoriscono il trasporto di materia ma limitano quello che è lo scambio termico portando delle volte a tempi di sublimazione più lunghi. Infatti la temperatura del prodotto svolge un ruolo fondamentale durante l'essiccamento primario. La sublimazione è un processo endotermico (richiede 670 cal/g), richiede una determinata quantità di energia che come conseguenza ha l'effetto di abbassare la temperatura dei campioni. Tale energia viene fornita incrementando la temperatura della camera e di conseguenza anche quella dei nostri prodotti. Attraverso l'abbassamento di pressione seguito da un innalzamento della temperatura del ripiano si favorisce l'intero processo con l'obiettivo di ridurre al minimo i tempi di essiccamento primario del prodotto (Pikal & Shah, 1990).

La velocità del processo di sublimazione durante la fase di essiccamento primario è definita come la massa di ghiaccio che evapora in funzione del tempo come viene illustrato da (Pikal, et al., 1990) ,

$$\frac{dm}{dt} = A_P \frac{p_{w,i} - p_{w,c}}{R_p} \quad (1.2)$$

Dove  $dm/dt$  corrisponde al rate di sublimazione,  $A_P$  è l'aria interna del prodotto in cui avviene il passaggio del flusso,  $p_{w,i}$  la tensione di vapore superficiale del ghiaccio e infine  $p_{w,c}$  costituisce la pressione parziale dell'acqua all'interno della camera. Invece il termine indicato con  $R_p$  rappresenta la resistenza al flusso di vapore costituita dallo strato di torta di prodotto essiccato e da fattori inerenti al sistema (es. tappo di silicone, camera).

Un altro parametro fondamentale durante la fase di essiccamento primario viene rappresentato dalla "temperatura di collasso" ( $T_c$ ) dei campioni che si differenzia a secondo delle formulazioni utilizzate. Risulta importante che durante la fase di sublimazione del prodotto congelato, la sua temperatura massima non sia mai superiore alla temperatura di collasso, altrimenti ci sarebbe la perdita macroscopica strutturale del campione. La temperatura di collasso risulta essere di solito due gradi più alta rispetto alla temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) e rispetto alla temperatura eutettica ( $T_{eu}$ ) (Pikal & Shah, 1990).



**Figura 1.8-** Processo essiccamento primario. Immagine modificata da (Kawasaki, et al., 2019)

## 1.1.5 Essiccamento secondario

L'ultimo stadio di un ciclo di liofilizzazione è l'essiccamento secondario. Dopo il fenomeno di sublimazione l'umidità residua presente nei campioni è circa tra il 5-20%. Tale quantità viene rimossa attraverso il fenomeno di deassorbimento generato dall'incremento della temperatura del ripiano durante il secondario (Pikal & Shah, 1990).

Tre parametri sono fondamentali durante l'essiccamento secondario: la temperatura del ripiano, l'area superficiale e il grado di porosità del prodotto solido. La temperatura del ripiano è usualmente di un valore tra 25 e 60 °C. Gli ultimi due parametri sono direttamente correlati al processo di congelamento, in quanto la dimensione dei pori e l'area superficiale specifica del prodotto secco dipendono dalla struttura dei cristalli di ghiaccio. Infatti in prodotti con aree superficiali minore e quindi con pori di dimensioni ridotte il processo di deassorbimento risulta essere più veloce. Contrariamente in prodotti aventi aree superficiali minori con dimensione di pori maggiore il deassorbimento risulta essere minore e la percentuale di umidità residua del prodotto maggiore rispetto al caso precedente.

## 1.2 Impianti di Liofilizzazione

Come già detto in introduzione le industrie farmaceutiche tradizionalmente lavorano utilizzando processi batch con consumi economici e di tempistiche di processo non marginali. L'utilizzo di processi continui o semi-continui permette di migliorare sia la qualità del prodotto che di ridurre i costi e i tempi di produzione (Capozzi, et al., 2019). Un processo batch è caratterizzato da lunghi tempi di produzioni e da grandi consumi d'energia rispetto a una produzione continua (Figura 1.9).

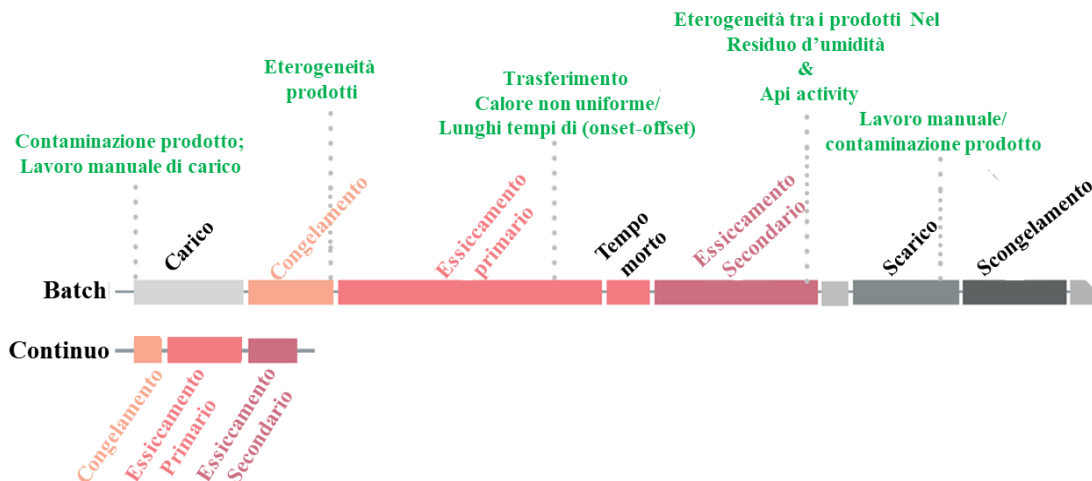
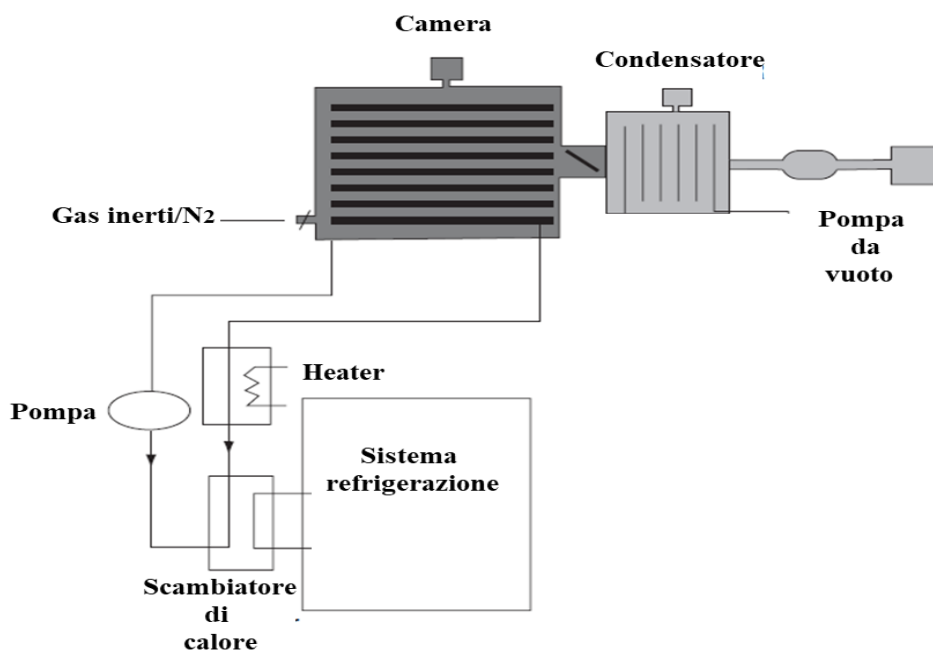


Figura 1.9- Tempi di Processo Batch Vs Continuo figura modifica da (Capozzi, et al., 2019)

## 1.2.1 Liofilizzazione batch

Un tipico impianto di liofilizzazione Batch (Figura 1.10) è costituito: da una camera contenete dei ripiani sui quali i flaconi vengono caricati, un sistema di refrigerazione, un condensatore in grado di congelare i gas evaporati durante l'intero processo e una pompa da vuoto. La pressione in camera è mantenuta ad un valore di set-point grazie all'utilizzo di gas inerti come ad esempio l'azoto. I prodotti sono a contatto con il ripiano, la quale temperatura è controllata attraverso lo scambio termico con un fluido (es. olio di silicone) che circola al suo interno. La temperatura del fluido è controllata attraverso il sistema di refrigerazione. Nell'impianto sono presenti anche dei sistemi di riscaldamento conosciuti anche come "heaters", in grado di aumentare la temperatura dei ripiani e di scongelare le eventuali sostanze presenti a fine ciclo nel condensatore (Franks & Auffret, 2007).

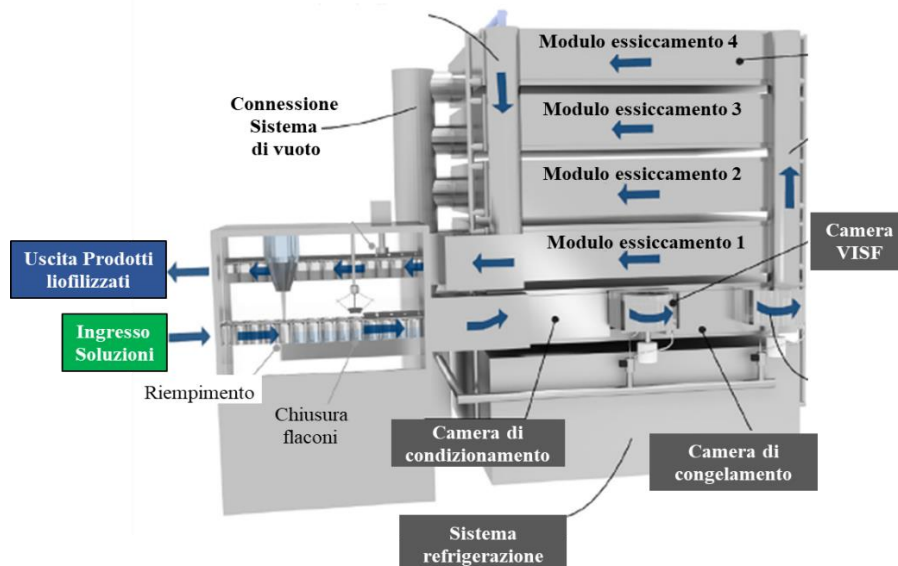


*Figura 1.10- Componenti di un impianto di liofilizzazione Batch Figura modificata  
modifiche da (Franks & Auffret, 2007)*

Un impianto batch presenta differenti svantaggi, costituiti ad esempio dalle fasi di carico e scarico del prodotto che hanno come conseguenza l'aumento del tempo di processo e il verificarsi di seri rischi di contaminazione. Difatti il primo step è costituito da diverse procedure che hanno l'obiettivo di garantire massimi valori di sterilità all'intero del sistema.

## 1.2.2 Liofilizzazione continua a flaconi sospesi

Gli ultimi studi di ricerca hanno proposto un nuovo metodo di liofilizzazione in continuo (Figura 1.11). In questo processo i flaconi sono sospesi su un binario e si muovono seguendo un circuito in diverse camere aventi condizioni di temperatura e pressione differenti. Nella prima sezione dell'impianto i flaconi sono riempiti in maniera continua e controllata. Successivamente avviene la fase di congelamento delle soluzioni che può essere realizzata attraverso il più classico processo di nucleazione spontanea o utilizzando tecniche di nucleazione controllata come ad esempio la VISF ("vacuum-induce surface freezing"). Con l'utilizzo di questa ultima tecnica sono previsti nell'impianto tre moduli connessi tra loro in serie: il modulo di condizionamento dove i prodotti sono equilibrati alla temperatura desiderata; il modulo di nucleazione, dove la pressione viene ridotta in modo da indurre l'evaporazione e la nucleazione delle soluzioni; in fine il modulo di congelamento dove viene completata la fase di congelamento del prodotto attraverso l'utilizzo di basse temperature. Dopo questo stadio i flaconi procedono verso la seconda sezione dell'impianto dove avvengono i processi di essiccamento primario e successivamente secondario del prodotto (Pisano, et al., 2019).



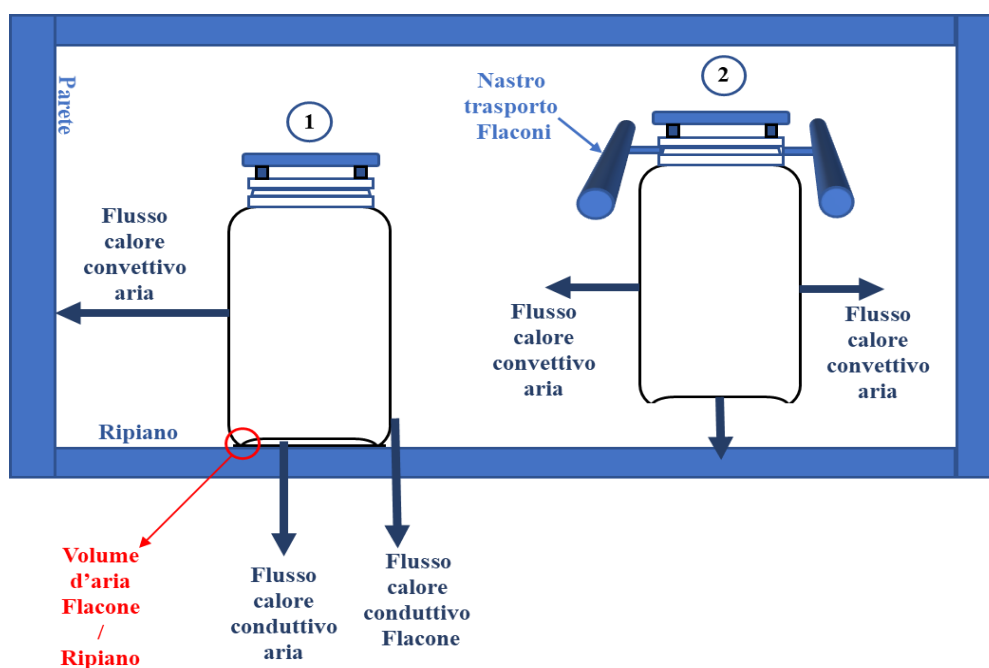
**Figura 1.11-** *Impianto di liofilizzazione continuo a flaconi sospesi immagine modificata da (Pisano, et al., 2019)*

Uno dei principali vantaggi di questa configurazione in continuo consiste nel ridurre di dieci volte il tempo di un ciclo produttivo rispetto alla più classica configurazione batch. Infatti è stato appurato che in una configurazione batch il tempo complessivo di processo è pari a 51 h; la maggior parte delle quali sono dedicate alle fasi di carico, scarico prodotti e ai vari processi di scongelamento, pulizia apparecchiatura. Invece in un processo continuo a flaconi sospesi è stato stimato che le ore di processo totali potrebbero anche essere solo pari a 6h, le quali interesserebbero solo le fasi di congelamento, essiccamento primario e eventualmente secondario (Fissore, et al., 2019).

### 1.2.3 Scambio di calore Batch Vs Flacons Sospesi

Lo scambio termico, a cui il prodotto è soggetto, è differente tra una configurazione batch e una a flacons sospesi, sia in fase di congelamento che in fase di essiccaamento.

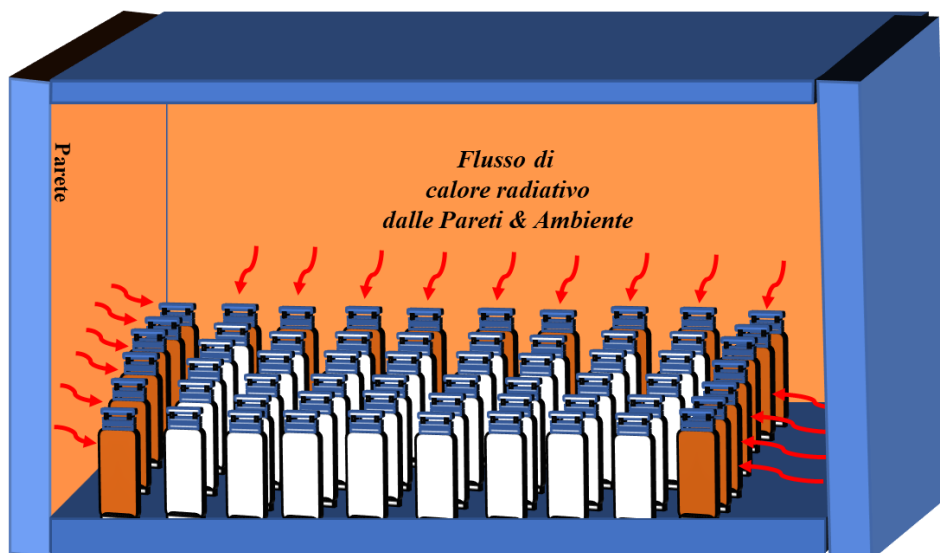
Nel caso di un processo di congelamento con configurazione batch, la temperatura del prodotto è sempre compresa tra la temperatura del ripiano e quella dell'aria presente in camera. In questa situazione il calore è rimosso principalmente nella parte inferiore del flacone attraverso due fattori conduttivi (Figura 1.12): il primo relativo al contatto diretto con il ripiano, il secondo riguardante l'aria presente nello spazio che si crea tra il fondo del flacone e il ripiano. Quest'ultima quantità è differente tra i vari campioni generando così problemi di disomogeneità all'interno del batch, in quanto la quantità di calore rimossa risulta essere differente tra i vari prodotti e così facendo anche la dimensione e morfologia dei cristalli di ghiaccio (Capozzi, et al., 2019)



**Figura 1.12-** Scambio termico in fase di congelamento delle configurazioni: Batch (1); Continua a flacons sospesi (2).

In una configurazione continua a flacone sospesi, durante la fase di congelamento, il calore viene rimosso essenzialmente attraverso un flusso convettivo d'aria (Figura 1.12). In questo caso, le calorie rimosse sono circa uguali per ogni flacone, in quanto tutte le superfici risultano essere nelle medesime condizioni ovvero circondate d'aria. La temperatura e la velocità di quest'ultima può essere teoricamente modellata per ottenere diversi protocolli di congelamento. Il risultato di tale condizione termica genera un maggiore omogeneità al livello di struttura cristallina e dimensione dei pori tra i vari flaconi. Attraverso analisi SEM, si è potuto verificare che la dimensione dei pori in tale configurazione è decisamente maggiore rispetto a una batch. Tale aspetto ha un'influenza sui tempi di sublimazione del prodotto che risultano essere decisamente inferiori in una configurazione di processo a flaconi sospesi (Pisano, et al., 2019).

Anche durante la fase di essiccamento primario vi è una differenza, riguardante lo scambio termico, tra una configurazione batch e una a flaconi sospesi. Nel primo caso infatti il calore irradiato risulta essere più intenso per i flaconi laterali del batch rispetto a quelli riposti centralmente (Figura 1.13). Questo ha come conseguenza tempi di sublimazione differenti tra i vari flaconi con valori di on-set e off-set molto distanti tra loro. In una configurazione sospesa tale effetto è notevolmente ridotto e la quantità di calore irradiata risulta essere costante per ogni flacone, assicurando tempi di sublimazione all'incirca uguali e una differenza tra il valore di on-set e off-set decisamente ridotta. Difatti il valore on-set indica l'istante di tempo in cui nella maggior parte dei flaconi presenti in camera il processo di sublimazione è terminato, mentre l'off-set indica il momento in cui tutti i flaconi hanno terminato il processo di sublimazione. Quindi minore è la differenza tra questi due valori maggiore risulterà l'uniformità dell'intero lotto di produzione.



**Figura 1.13-** Conformazione Batch durante la fase di essiccamento primario. Differenza di intensità di flusso irradiato di calore tra i flaconi esterni e interni.



### 1.3 Obiettivo tesi

L'obiettivo di tale tesi consiste nel porre a confronto il sistema di liofilizzazione batch con la configurazione continua a flaconi sospesi. Per questo fine si sono effettuate diverse prove sperimentali e valutati differenti parametri di processo. Il progetto principale di tesi ha riguardato prove di congelamento di una soluzione con concentrazione di 0.01 mg/ml di LDH (Lactate deidrogenase) in buffer citrato 10 mM con pH 6.5 con %5 di saccarosio. Durante il processo di congelamento per entrambe le configurazioni è stata applicata la tecnica VISF per controllare la temperatura di nucleazione a diversi valori quali:  $T_n = -2^\circ\text{C}$ ;  $T_n = -6^\circ\text{C}$ . Successivamente è stata applicata una fase di "mantenimento" impostando la temperatura del ripiano ad un valore  $T_m$ , prima di procedere con una rampa di congelamento. La fase di mantenimento ha come obiettivo indurre l'accrescimento cristallino in soluzione, generando un'interfaccia ghiaccio/acqua con un'estensione minima e avente nuclei cristallini di grosse dimensioni. In seguito sono stati analizzati i valori di attività residua della proteina nelle varie prove, svolte con temperatura di nucleazione del prodotto differente, con l'obiettivo di identificare quale fosse la migliore procedura applicativa e quali le differenze fra le due modalità di processo batch e a flaconi sospesi. Una volta preso nota dei risultati d'attività residua proteica, si sono svolte analisi riguardanti lo scambio termico durante la fase di congelamento per tutte e due le configurazioni. Successivamente si sono correlati i dati ottenuti attraverso lo studio dell'analisi termica con i valori di attività residua proteica, con lo scopo di individuare quali fossero le differenze sostanziale tra le due configurazioni durante la fase di congelamento. Inoltre sono state svolte prove di liofilizzazione condotte sia in configurazione batch e sia in configurazione a flaconi sospesi. Il fine è stato quello di monitorare quali fossero, tra le due configurazioni, le differenze su parametri di processo del tipo: tempi di sublimazione durante l'essiccamento primario, valori di on-set e off-set, analisi di umidità residua e infine analisi di attività biologica enzimatica (di LDH) espresse secondo unità internazionali (IU/mL). In conclusione si sono confrontati i risultati ottenuti dall'utilizzo dei due differenti modelli, valutando quali fossero i punti di forza di un sistema continuo a flaconi sospesi rispetto a un sistema batch e quali invece i parametri in cui quest'ultimo risulta essere ancora più efficiente.



## 2. Materiali e metodi utilizzati per le analisi delle prove sperimentali

In questo capitolo si illustreranno i materiali e le apparecchiature utilizzate per effettuare le prove sperimentali. Inoltre verranno descritti i metodi applicati per le analisi dei differenti parametri di processo. L'intera parte riguardante le prove sperimentali e le attività di laboratorio, sono state svolte nei laboratori di ricerca del gruppo Molecular Engennering Laboratory del dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologie (DISAT), facenti parte del Politecnico di Torino.

### 2.1 Caratterizzazione termica

Sono state effettuate analisi di caratterizzazione termica sulle soluzioni successivamente utilizzate nelle prove sperimentali di congelamento e liofilizzazione. Queste prove hanno consentito di determinare la temperatura critica delle soluzioni prese in esame, al di sotto della quale deve essere condotta la fase di essiccamento primario. Le apparecchiature utilizzate sono la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e il Criomicroscopio (FDM).

#### 2.1.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è un metodo di misura ben consolidato che viene utilizzato in larga scala in diverse aree di ricerca e di sviluppo. L'utilizzo di tale apparecchiatura permette di identificare i principali effetti termici che si verificano su una determinata sostanza sottoposta ad una variazione controllata di temperatura. Infatti utilizzando campioni dal peso di pochi microgrammi (mg) è possibile determinare proprietà della nostra soluzione come:

- La temperatura di transizione vetrosa  $T_g$ ;
- La temperatura eutettica  $T_{eu}$ ;
- Il grado di cristallizzazione;
- La temperatura di cristallizzazione;
- Capacità termica;
- Calore di transizione;
- Dati cinetici.

La tecnica consiste nell'inserimento di crogioli l'alluminio (TZERO pan, TA Instruments, New Castel, DE, USA), scelti in modo da resistere alle temperature di prova senza interagire con la soluzione in esame. Solo uno dei due crogioli viene riempito con una specifica quantità (intorno ai 30 mg), mentre il restante rimane vuoto in quanto serve come riferimento per la misura differenziale. Infatti la DSC consiste nel monitorare la differenza di flusso di calore sviluppato

dai due campioni, mantenuti durante l'intero processo alla stessa temperatura. Durante la variazione di quest'ultima, il campione contenente la sostanza da analizzare subisce fenomeni fisici quali reazioni di natura esotermica (es. nucleazione) che innalzeranno la sua temperatura. Il campione vuoto non subisce alcuna trasformazione mantenendosi alla temperatura target di processo. Quindi durante un fenomeno termico il calore necessario, per mantenere il prodotto alla temperatura di riferimento, cambia e contemporaneamente varia anche il suo flusso termico rispetto al campione vuoto utilizzato come target (Gill, et al., 1993). Quindi attraverso questa analisi termica possono essere ricavati i parametri citati precedentemente.

In questo progetto di tesi si è utilizzata la calorimetria a scansione differenziale per individuare la temperatura di transizione vetrosa (T<sub>g</sub>) del saccarosio utilizzato come eccipiente nelle soluzioni a diverse concentrazioni. Sono state preparate tre soluzioni di buffer citrato 10 mM a pH 6.5 contenenti ognuna diverse concentrazioni in peso di saccarosio quali: 5%, 10% e 15%. Tali soluzioni sono state successivamente utilizzate nelle prove di congelamento e di liofilizzazione, con l'aggiunta di una proteina modello nella soluzione contenete una concentrazione in peso pari al 5%. I campioni utilizzati per le analisi termiche con i corrispettivi pesi sono illustrati in Tabella 2.1.

**Tabella 2.1-** Riassunto Campioni analizzati prove DSC

<b>Nome</b>	<b>Formulazione</b>	<b>Peso</b>
<b>A</b>	Saccarosio 5%	38.6 mg
<b>B</b>	Saccarosio 10%	37.7 mg
<b>C</b>	Saccarosio 15%	37,0 mg

L'analisi tramite DSC viene condotta a pressione atmosferica e prevede soltanto una variazione di temperatura in un range molto ampio in cui non viene condotto nessun tipo di essiccamento primario. Tutte le 3 prove sono state eseguite mediante l'utilizzo di una DSC 200 (TA Instruments, New Castel, DE, USA); nella cella in cui sono state condotte le prove è stata creata un'atmosfera inerte, introducendo 50ml/min di azoto al suo interno.

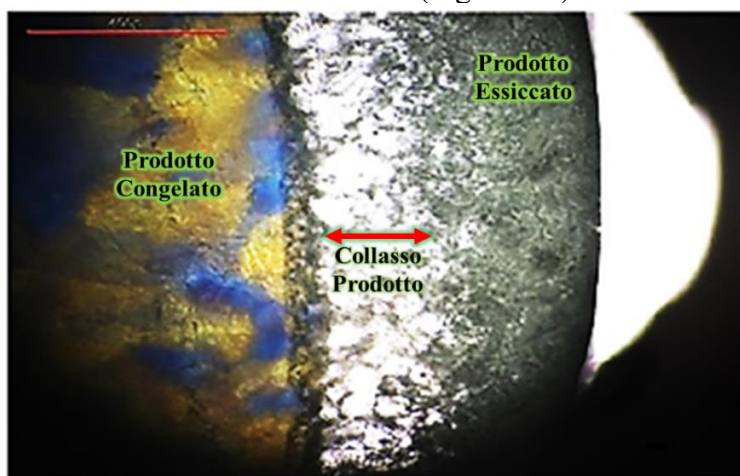
Il protocollo eseguito per ogni prova è stato il medesimo e viene illustrata in Tabella 2.2.

**Tabella 2.2-** protocollo utilizzato durante le prove DSC

Step	Procedura	Protocollo
1	Equilibrio a 25 °C	1 min
2	Rampa a -60 °C	2.00 °C/min
3	Equilibrio a -60 °C	5 min
4	Rampa 20 °C	2.00 °C/min
5	Equilibrio a 25 °C	/

### 2.1.2 Criomicroscopio (FDM)

La tecnica di caratterizzazione termica, mediante l'utilizzo del Criomicroscopio (*Freeze-Drying Microscope*), è ampiamente utilizzata in ambito farmaceutico per ricavare informazioni importanti, utilizzate successivamente per lo sviluppo delle soluzioni e l'interpretazione dei risultati ottenuti nelle prove sperimentali di liofilizzazione. Difatti tale apparecchiatura funziona in qualche modo come un liofilizzatore in miniatura. Il primo step consiste nel congelare il campione all'interno di una piccola camera del microscopio, attraverso applicazione di una rampa di temperatura, con l'utilizzo di azoto liquido. Il secondo step consiste nell'applicazione in camera di un grado di vuoto con un successivo aumento di temperatura. Tale procedura risulta estremamente simile alla fase di sublimazione che avviene durante l'essiccamento primario durante un ciclo di liofilizzazione (Kasraian, et al., 1998). Durante l'incremento di temperatura, il fronte di sublimazione viene osservato e registrato al microscopio. I cambiamenti nel fronte di sublimazione possono essere utilizzati per determinare lo stato del sistema (amorfo o cristallino) e la temperatura di colosso ( $T_c$ ) del campione. Quest'ultima rappresenta la temperatura superata la quale il prodotto in fase di sublimazione perde la sua struttura macroscopica trasformandosi in un fluido viscoso (Figura 2.1).

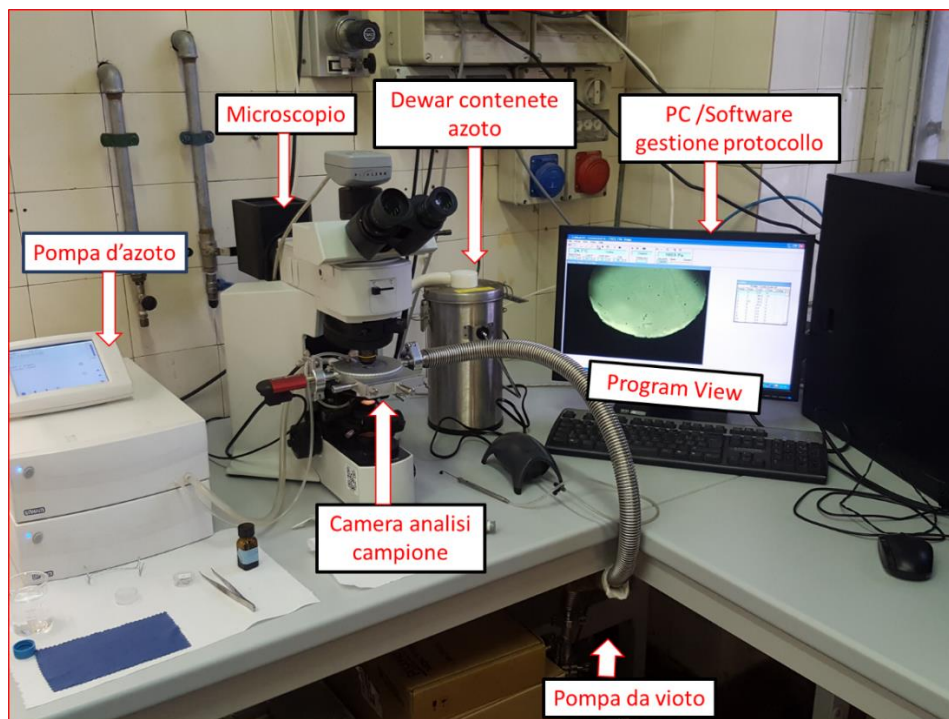


**Figura 2.1-** Rappresentazione fase di collasso attraverso FDM di una soluzione 4% in peso di saccarosio. Immagine modificata da (Bjelošević, et al., 2018)

Risulta importante analizzare e valutare il valore della  $T_c$  di una soluzione in quanto viene utilizzata per determinare le condizioni ottimali di temperatura di processo durante la fase di essiccazione primario. Infatti durante questa fase la temperatura del prodotto deve essere mantenuta ad un valore prossimo alla  $T_c$ , ma mai superiore al fine di garantire la sua integrità strutturale (Pikal, et al., 1990).

L'apparecchiatura utilizzata durante le prove dispone di diverse componenti (rappresentati in figura 2.2) quali:

- Un computer, collegato al microscopio e alla pompa d'azoto, in cui è presente un software in grado di gestire il protocollo del processo d'analisi e di memorizzare dati e relative immagini (Linkam, Scientific Instruments, Tadworth, Surrey, UK, modello PE95-T95);
- Microscopio ottico (BX51, Olympus Europa, Hamburg, Germany);
- Un contenitore contenente azoto liquido chiamato Dewar;
- Pompa a vuoto connessa alla camera d'analisi situata nel microscopio.



**Figura 2.2-** Immagine del FDM utilizzato per le analisi di caratterizzazione termica Dipartimento di scienze applicate (DISAT) del Politecnico di Torino

I campioni analizzati in questo progetto di tesi riguardano essenzialmente due soluzioni di buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con differenti concentrazioni in peso di saccarosio. La prima soluzione avente una percentuale in peso di saccarosio del 5%, mentre la seconda soluzione avente una percentuale in peso dello stesso eccipiente pari al 10%. Da entrambe le due soluzioni si è prelevato un campione di volume pari a 3  $\mu$ l successivamente riposto in camera d'analisi all'interno del microscopio.

L'obiettivo dell'analisi mira ad analizzare la temperatura di collasso in entrambe le soluzioni. Il protocollo eseguito nelle prove è stato il medesimo per entrambe le soluzioni e viene riassunto in Tabella 2.3.

*Tabella 2.3- Protocollo eseguito per analisi FDM di soluzione di saccarosio al 5% e 10%*

<b>Step</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Rampa termica</b>	<b>Pressione</b>
<b>1</b>	0 °C	7 °C/min	/
<b>2</b>	-50 °C	2 °C/min	
<b>3</b>	/	/	10 Pa
<b>4</b>	-36 °C	1 °C/min	10 Pa
<b>5</b>	-28 °C	0.5 °C/min	10 Pa
<b>6</b>	+20 °C	5 °C/min	

## 2.2 Prove di congelamento

Sono state eseguite varie prove di congelamento con l'obiettivo di valutare l'attività residua dell'enzima L-Lactate dehydrogenase (LDH, estratta dal muscolo del coniglio, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). La proteina è stata studiata in condizioni di stabilità ovvero a pH 6.5 neutro. Ogni singola prova di congelamento è stata effettuata sia attraverso una configurazione batch con flaconi posti direttamente al contatto con il ripiano, sia con l'utilizzo di una apparecchiatura che ha permesso di ottenere una configurazione a flaconi sospesi in cui non vi è il contatto con il ripiano. Le due modalità sono illustrate in Figura 2.3.



**Figura 2.3-** Configurazioni utilizzate durante le prove di congelamento, nel riquadro blu viene raffigurata la modalità a flaconi sospesi, nel riquadro rosso la configurazione batch.

### Preparazioni delle formulazioni

Sia per le prove con configurazione in sospeso che per le prove batch la soluzione utilizzata è stata la medesima ovvero 0.01 mg/ml di LDH in buffer citrato 10 mM pH 6.5 con una concentrazione di saccarosio in peso del 5%. La procedura utilizzata per la realizzazione di tale formulazione si divide in diversi passaggi. Il primo consiste nel preparare 6 litri di buffer citrato 10 mM a pH 6.5, utilizzati per effettuare il processo di dialisi del LDH. Si prelevano almeno 2 ml di LDH e si ripongono insieme ad 5 ml di buffer, in una capsula cilindrica (Pur-A-Lyzer tube, capacity 3-10 ml, PURNR-1EA, trademark of Sigma - Aldrich, Israel) avente una membrana semi-premiabile avente un cut-off 3.5 kDa (massa molecolare oltre la quale la membrana impedisce il passaggio delle molecole in soluzione). Con l'utilizzo di un galleggiante (floating rack, Pur-A-Lyzer Mega3550 Dialysis kit, Sigma-Aldrich, Israel) si fa fluttuare la capsula cilindrica in un becker contenente almeno 2 L di buffer citrato portato alla temperatura di 4 °C grazie all'utilizzo di sistema di raffreddamento (serpentina in cui ricircola glicole etilenico come fluido refrigerante). Il buffer viene cambiato ogni 3 ore per 2 volte consecutive questo per assicurare il completamento del processo di dialisi. Dopo di che si riempiono due microcuvette con 80 µl di soluzione contenente LDH prelevata dalla capsula e con 720 µl di buffer citrato. Le due microcuvette vengono analizzate attraverso uno spettrofotometro UV/visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), da dove si ricavano i valori di assorbanza ad una lunghezza d'onda pari a 280 nm. Conosciuti i valori di assorbanza dei due campioni si effettua una media e attraverso la legge di Lambert- Beer (conoscendo il coefficiente d'estensione molare pari a 1.44ml/(mgcm)), si ricava il valore di



concentrazione di LDH della soluzione presente nelle due microcuvette. Tale valore è stato moltiplicato per un fattore dieci in modo da conoscere la concentrazione di LDH all'interno della capsula cilindrica. Una volta conosciuta tale quantità si sono costituite 20 aliquote (Micro Tubes, AH biotechnologie GmbH, P-152473, Germany) ciascuna con un volume pari a 2 ml di soluzione a 0.1 mg/ml di LDH in buffer citrato 10mM a pH 6.5. Le aliquote sono state riposte in freezer e fatte congelare a -80 °C e successivamente utilizzate sia per le prove di congelamento che per le prove di liofilizzazione.

Dopo tali step per ogni prova di congelamento (e di liofilizzazione) sono state preparate delle soluzioni di buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con una concentrazione di saccarosio al 0.55% in peso e di volume pari a 11.7 mL. Le soluzioni sono poi state filtrate con l'utilizzo di una siringa (Norm-ject Luer-Solo, 12 ml, B. Braun Melsungen, Germany) ed i un filtro (Milex – GV, 33 mm, merck Millipore Lfd, Carrigtwohill, IRELAND). Dopo di che, per ogni esperienza, è stata scongelata un'aliquota di LDH e si è prelevato un volume di 1.3 ml ed aggiunto alla soluzione di saccarosio portando il volume finale a 13 ml. Così facendo per ogni prova si è costituita una soluzione al 0.01 di LDH in buffer citrato 10 mM a 6.5 pH avente una concentrazione di saccarosio pari 0.5% in peso. Inoltre è stata preparata una soluzione di buffer citrato al 5% in peso di saccarosio, anche essa filtrata, priva del principio proteico, utilizzata per riempire i flaconi in cui sono state riposte le termocoppie, in modo da monitorare la temperatura dei campioni durante il processo di congelamento.

### Condizione e Layout delle prove

In tutte le prove di congelamento sia per la configurazione in sospenso, che per la configurazione batch, il numero di flaconi preparati è stato il medesimo corrispondente a:

- 6 flaconi 4 R (16×45 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piobino Dese, Italia), contenete ciascuno 1 ml di soluzione al 0.01 mg/mL di LDH in buffer citrato 10mM a 6.5 pH con il 5% in peso di saccarosio (illustrata nella sezione formulazioni). Ogni flacone è stato pre-stoppato utilizzando tappi di silicone (West Pharmaceutical Service, Milan, Italia);
- 2 flaconi 4R, contenenti ciascuno 1 ml di soluzione avente buffer citrato a pH 6.5 con una percentuale in peso di saccarosio pari al 5% priva del principio proteico (vedi sezione formulazioni); tali flaconi sono stati ugualmente pre-stoppati e al loro interno sono state riposte le termocoppie.

Le prove totali effettuate risultano essere pari a dieci, 5 con una configurazione batch e 5 con una configurazione a flaconi sospesi. Durante il processo di congelamento per ogni esperienza è stata utilizzata la tecnica VISF per il controllo della temperatura di nucleazione dei prodotti. Le temperature dei prodotti  $T_n$ , per entrambe le configurazioni (Batch e Sospenso) a cui si è indotto il processo di nucleazione, sono -2°C e -6°C. Inoltre, le prove batch e con flaconi sospesi possono essere divise in due gruppi avanti procedure post-nucleazione differenti. Le condizioni adottate per le varie prove di (congelamento sono riportate in Tabella 2.4 e nello specifico si può osservare che:

- Nella prima procedura rientrano tutte le prove (1b,2b,3b,1s,2s,3s) in cui dopo aver svolto il processo di nucleazione mediante tecnica VISF, si è impostato un valore di temperatura del ripiano pari a  $T_m$  (differente tra caso Batch e Sospeso); dopo di che i campioni sono stati mantenuti in tale condizione termica per circa 45 minuti, prima di procedere alla fase di congelamento (velocità raffreddamento: 0.5 °C/min), in cui si è impostata una temperatura di ripiano pari a -45 °C.
- Il secondo gruppo è composto dalle prove (4b,5b,4s,5s) in cui non vi è stata nessuna fase di “mantenimento”, ma bensì dopo il processo di nucleazione dei prodotti si è proceduto direttamente a una fase di congelamento (0.5 °C/min) della soluzione impostando una temperatura di ripiano pari a -45°C.

*Tabella 2.4- Parametri di processo prove congelamento*

Configurazione	N ~ Prova	Fase nucleazione		Fase di
		$T_n$	$T_{ripiano}$	“Mantenimento”
BATCH	1b	-2°C	-5°C	-5°C
	2b	-6°C	-10°C	-10°C
	3b	-2°C	-5°C	-10°C
	4b	-3°C	-5°C	/
	5b	-6°C	-10°C	/
SOSPESO	1s	-2°C	-12°C	-12°C
	2s	-6°C	-18°C	-18°C
	3s	-2°C	-18°C	-18°C
	4s	-2°C	-12°C	/
	5s	-6°C	-18°C	/

Come si evince in Tabella 2.4 le prime tre prove sia per il caso batch che per il caso sospeso hanno previsto una fase di “mantenimento”. Al contrario tale fase risulta essere assente nelle ultime due prove per entrambe le configurazioni (4b-5b; 4s-5s). Un altro fattore possibile da notare è la temperatura a cui è prevista la nucleazione del prodotto (-2°C, -6°C), la medesima per entrambe le configurazioni. Per fare questo si è variata la temperatura del ripiano che sia nella fase di nucleazione che nella fase di mantenimento ( $T_m$ ) è differente per le due modalità di processo.

I flaconi di ogni singola prova sono stati estratti dalla camera dopo la fase di congelamento e scongelati mediante contatto con acqua a temperatura ambiente (immersione a metà altezza in una bacinella piena d’acqua). Dopodiché di che si è proceduto con la fase di diluizione e d’analisi dell’attività biologica dell’LDH.

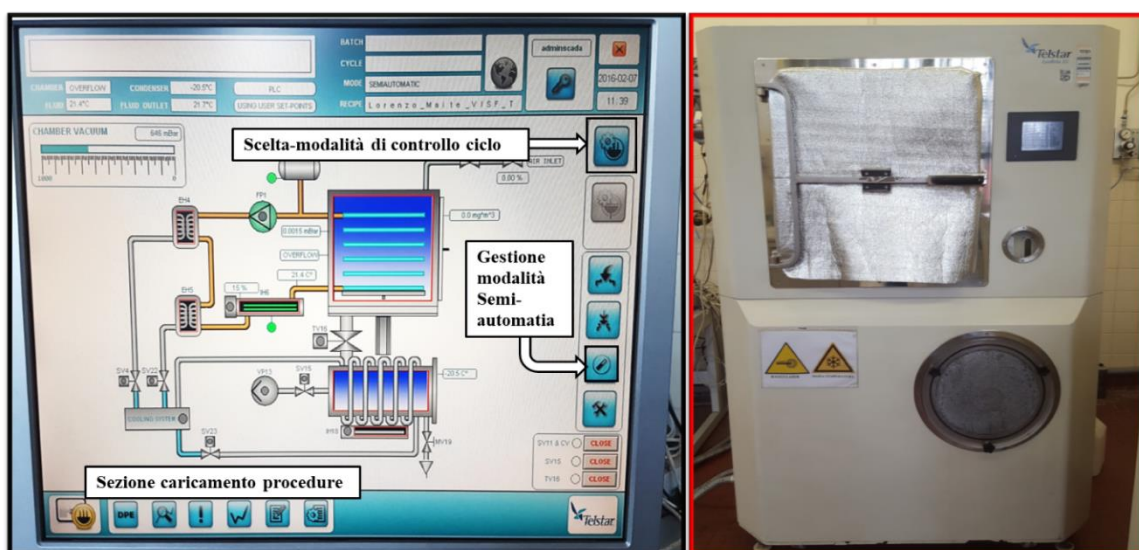
## Impianto Liofilizzazione

Sia per le prove di congelamento che per le prove di liofilizzazione a ciclo completo è stato utilizzato il liofilizzatore LyoBeta 25 TM Teslar (Teressa, Spagna), apparecchiatura presente nei laboratori del dipartimento di tecnologia applicata (DISAT) del Politecnico di Torino.

Il liofilizzatore LyoBeta è costituito dalle seguenti componenti:

- Camera da 0.2 m<sup>3</sup> composta da 4 ripiani aventi un'area di circa 0.16 m<sup>2</sup>;
- Misuratore di pressione capacitivo (Baratron type 626°, MKS Instruments, Andover , MA,USA, fondo scala 10mbar);
- Misuratore di pressione a conducibilità termica (pirani type PSG-101-S, Inficon, Bad Ragaz ,Switzerland);
- Sistema di refrigerazione;
- Pompa a vuoto (Agylent Variant DS402; Agylent Technologies, Santa Clara, California, Stati Uniti);
- Termocoppie di tipo T, per la misura della temperatura dei prodotti e per l'analisi riguardanti lo scambio termico nelle varie fasi del ciclo di liofilizzazione;
- Condensatore esterno, che è in grado di operare ad una temperatura di circa -80 °C;
- Pc con installato un programma in grado di gestire il ciclo di liofilizzazione in due diverse modalità: Automatica o Semi - Automatica. Attraverso il software è possibile inserire le procedure e i parametri con cui svolgere la fase di congelamento e di essiccamento. Inoltre in schermata principale vengono visualizzate tutte le componenti dell'apparecchiatura dando la possibilità all'operatore di osservare la loro funzione durante l'intero ciclo.

In Figura 2.4 vengono illustrati sia il Pc contenente il software di gestione dell'apparecchiature e sia il liofilizzatore utilizzato durante le prove sperimentali.



**Figura 2.4-** A destra liofilizzatore utilizzato durante le prove di congelamento e liofilizzazione; a sinistra il software utilizzato per la gestione delle procedure e il funzionamento dei macchinari;

## 2.3 Prove di liofilizzazione

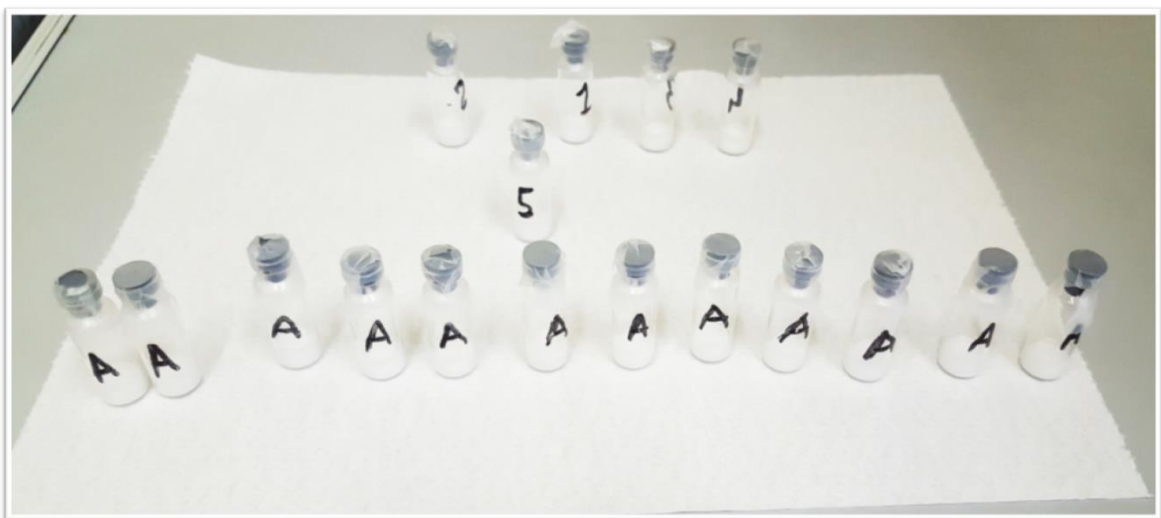
Nel progetto di tesi sono state anche svolte prove con completo ciclo di liofilizzazione in cui oltre una fase di congelamento sono state effettuate sui prodotti le fasi di essiccamento primario e secondario. Il liofilizzatore utilizzato è stato il LyoBeta 25<sup>TM</sup> Telstar (Terrassa, Spagna). Le prove effettuate a secondo delle soluzioni utilizzate e delle procedure svolte possono essere divise in due gruppi sostanziali.

### Prove di essiccamento a differente temperatura di nucleazione

Nel primo gruppo rientrano tutte le prove in cui si è utilizzata una soluzione del 0.01 mg/ml di LDH in buffer citrato 10 mM a 6.5 pH al 5% di saccarosio in peso. L'obbiettivo principale è stato quello di valutare l'influenza della temperatura di nucleazione sull'attività biologica residua dell'LDH. A questo scopo si sono condotte varie prove variando la temperatura di nucleazione, -2°C e -6°C. Ogni prova è stata effettuata sia in modalità batch e sia attraverso una configurazione a flaconi sospesi che emula il comportamento della liofilizzazione in continuo. Inoltre in fase di congelamento è stata applicata la VISF come tecnica per il controllo della temperatura di nucleazione.

Per ciascuna prova si sono utilizzati 19 flaconi di tipo 4R (vedi Figura 2.5), pre-tappati usando un tappo di silicone fi tipo igloo. Nello specifico, i flaconi sono stati così preparati:

- 12 flaconi 4R contenenti ciascuno 1 ml di soluzione 0.01 mg/ml di LDH in buffer citrato 10 mM a 6.5 pH al 5% di saccarosio in peso;
- 5 flaconi 4R contenenti ciascuno 1 ml di soluzione al 5% di saccarosio in buffer citrato; tali soluzioni sono prive del principio proteico e sono destinati per analisi riguardanti l'umidità residua;
- 2 flaconi 4R anche essi contenenti 1 ml di soluzione al 5% di saccarosio in buffer citrato; sono stati utilizzati per la valutazione della temperatura dei prodotti durante il ciclo mediante termocoppie di tipo T.



**Figura 2.5-** Immagine Flacons liofilizzati: 12 campioni in prima fila contenenti LDH destinati all'analisi d'attività proteica; 5 flacons privi di proteina destinati all'analisi d'umidità residua

Nel complesso si sono coinvolte sei prove di liofilizzazione:

- Tre prove(1b\*,2b\*,3b\*) riguardanti l'utilizzo della configurazione batch in cui la procedura utilizzata nella fase di congelamento è stata la medesima delle prove 1b,2b,3b (riportate in Tabella 2.4, paragrafo 2.2 Prove di Congelamento);
- Tre prove (1s\*,2s\*,3s\*) riguardanti l'utilizzo della configurazione in sospeso in cui anche qui la procedura e i parametri utilizzati in fase di congelamento sono stati i medesimi delle prove 1s,2s,3s (riportate in Tabella 2.4, paragrafo 2.2 prove di congelamento).

Per tutte le prove dopo la fase di "mantenimento" è stato assicurato il completo congelamento dei prodotti portando il ripiano ad una temperatura di -45 °C con una velocità pari a 0.5 °C/min; il protocollo utilizzato per tale fase è riportato negli step 1-2 in Tabella 2.5. A fine di ogni ciclo si è proceduto nella diluizione di 6 flaconi contenenti LDH e alla loro successiva analisi d'attività proteica. I restanti prodotti sono stati opportunamente riposti in frigo ad una temperatura di -20 °C.

Inoltre in Tabella 2.5 è riportato il protocollo utilizzato riguardante le fasi di essiccamento primario e secondario che risulta essere stato il medesimo per le sei prove di liofilizzazione.

*Tabella 2.5- Protocollo utilizzato post Nucleazione e Mantenimento nelle Prove di Liofilizzazione*

<b>Step</b>	<b>Fase Processo</b>	<b>Temperatura Ripiano</b>	<b>Pressione</b>	<b>Velocità /Tempo</b>
<b>1</b>	Rampa - Congelamento	-45 °C	/	0.5 °C/min
<b>2</b>	Mantenimento - Congelamento	-45 °C	/	4 h
<b>3</b>	Vuoto - Camera		5 Pa	
<b>4</b>	Rampa - Essiccamento Primario	-20 °C	5 Pa	0.5 °C/min
<b>5</b>	Mantenimento - Essiccamento Primario	-20 °C	5 Pa	24 h
<b>6</b>	Rampa-Essiccamento Secondario	20 °C	5 Pa	2 h di Rampa
<b>7</b>	Mantenimento - Essiccamento Secondario	20 °C	5 Pa	4 h
<b>8</b>	Scarico - Flaconi	/	/	/

### Prove di essiccamento a differente concentrazione di eccipiente in soluzione

Il secondo gruppo di prove è stato svolto con una metodica differente in quanto le prove di essiccamento svolte hanno previsto l'utilizzo di soluzioni di buffer citrato 10mM a pH 6.5 con differenti concentrazioni di saccarosio in peso. Infatti, si sono utilizzate soluzioni aventi una concentrazione di eccipiente differente pari al 5%, 10% e 15% (p/p). Il principio proteico in questo caso non è presente, in quanto l'obbiettivo di tali prove mira nella valutazione di parametri riguardanti: tempi di sublimazione, temperature dei campioni durante l'essiccamento primario e analisi di umidità residua. Ogni prova a differente concentrazione di solido è stata effettuata sia in modalità batch che in configurazione continua a flaconi sospesi. Il numero di prove effettuate risultano pari a sei: tre in modalità batch e tre in modalità sospesa (ognuna con differente concentrazione di eccipiente in soluzione). Gli esperimenti effettuati con le corrispettive formulazioni vengono riassunti in Tabella 2.6

**Tabella 2.6-** Formulazioni utilizzate durante Prove di Liofilizzazione a differente concentrazione di solido

<b>Configurazione</b>	<b>Nome // N° Prova</b>	<b>Concentrazione Eccipiente</b>
<b>Batch</b>	1b**	5% Saccarosio
	2b**	10% Saccarosio
	3b**	15% Saccarosio
<b>Sospeso</b>	1s**	5% Saccarosio
	2s**	10% Saccarosio
	3s**	15% Saccarosio

Sono stati preparati per ogni prova 19 flaconi 4R contenenti ognuno un 1 ml di soluzione opportunamente filtrata. Ogni flacone prima di essere inserito in camera è stato opportunamente pre-stoppato mediante l'utilizzo di tappi di silicone. Cinque dei flaconi preparati per ogni prova sono stati successivamente utilizzati per analisi d'umidità residua.

La procedura di liofilizzazione utilizzata è stata la medesima (Tabella 2.7) per tutte le prove. Infatti per ogni ciclo la temperatura alla quale è stata effettuata la nucleazione dei prodotti (mediante tecnica VISF) risulta essere pari a -2 °C. Successivamente come nelle altre prove si svolta una fase di "mantenimento" impostando la temperatura del ripiano ad un valore T<sub>m</sub>, differente tra le due configurazioni Batch e Sospeso. Anche le fasi di essiccamento primario e secondario hanno previsto il medesimo protocollo per tutte le prove.

**Tabella 2.7-** Procedura utilizzata per le Prove di Liofilizzazione a differente concentrazione di solido

Step	Fase Processo	Temperatura Prodotto	Temperatura Ripiano (Batch)	Temperatura Ripiano (Sospeso)	Pressione	Velocità /Tempo
1	Rampa Congelamento	/	-5 °C	-12 °C	/	0.5 °C/min
2	Mantenimento Congelamento	-2 °C	-5°C	-12 °C	/	30 min
3	Nucleazione	-2 °C	-5 °C	-12 °C	/	/
4	Rampa Congelamento	/	-45 °C	-45 °C	/	0.5°C/min
5	Mantenimento Congelamento	/	-45 °C	-45 °C	/	4 h
6	Vuoto - Camera	/	-45 °C	-45 °C	5 Pa	/
7	Rampa - Essiccamento Primario	/	-20 °C	-20 °C	5 Pa	0.5 °C/min
8	Mantenimento - Essiccamento Primario	/	-20 °C	-20 °C	5 Pa	24 h
9	Rampa- Essiccamento Secondario	/	-20 °C	20 °C	5 Pa	2 h di Rampa
10	Mantenimento - Essiccamento Secondario	/	20 °C	20 °C	5 Pa	4 h
11	Scarico - Flaconi	/	/	/	/	/

## 2.4 Analisi dell'attività biologica di LDH

Il Lactate dehydrogenase (LDH) è un enzima ossidoreduttasi che catalizza l'interconversione del piruvato in lattato. Le cellule rilasciano tale proteina nel flusso sanguigno dopo danni ai tessuti o emolisi dei globuli rossi. La sua presenza in elevate quantità può risultare un indice di allarme per alcune patologie genetiche come, ad esempio, il cancro. La determinazione della concentrazione di LDH è quindi importante per varie applicazioni in ambito medico. In questo lavoro di tesi si è utilizzato uno specifico kit in grado di quantificare il residuo proteico presente nei campioni dopo le prove di congelamento e di liofilizzazione. Attraverso l'utilizzo del kit LDH riduce il NAD in NADH, la cui quantità viene rilevata specificatamente mediante test calorimetrico ad una lunghezza d'onda pari a 450 nm. Il dosaggio risulta essere rapido, conveniente e sensibile.

In questo progetto di tesi è stato utilizzato il Lactate Dehydrogenase Activity Assay kit (MAK066, Sigma-Aldrich, USA), composto da una serie componenti. Questi ultimi sono stati ricostituiti prima di una serie di test d'attività enzimatica, seguendo la seguente metodica:

- LDH Assay Buffer (MAK066A): portato a temperatura ambiente prima di ogni analisi d'attività;
- LDH Substrate Mix (MAK066A): ricostituito in 1 ml d'acqua sterile (Fresenius Kabi Italia S.r.l. , A.I.C 030757049). Stabile per una settimana a 4 °C e un mese se tenuto a -20 °C;
- 1.25 mM NADH Standard (MAK066C): ricostituito in 400 µL d'acqua sterile per generare una soluzione standard di 1.25 mM. Quest'ultima risulta essere stabile per una settimana a 4°C e per un mese a -20°C.

Prima di ogni test inoltre sono stati utilizzati due dei componenti del kit LDH Assay Buffer e LDH Substrate Mix, per la realizzazione di una soluzione che prende il nome di Master Reaction Mix. La proporzione in soluzione delle due sostanze è espressa in Tabella 2.8; le quantità dei due componenti sono state variate in base alle esigenze riguardanti le analisi, mantenendo però ogni volta lo stesso rapporto.

*Tabella 2.8- Formulazione Master Reaction*

Reagente	Master Reaction Mix
LDH Assay Buffer	48 µL
LDH Substrate Mix	2 µL



## Protocollo di Analisi

Le analisi d'attività residua proteica sono state svolte per le seguenti prove:

- Per le 6 prove di congelamento 1b,2b,3b,1s,2s,3s riguardanti sia la configurazione batch che la configurazione in sospenso (riportate nel paragrafo, prove di congelamento);
- Per i 6 prove con ciclo completo di liofilizzazione, quali 1b\*,2b\*,3b\*,1s\*,2s\*,3s\*.

A fine di ogni prova sono stati utilizzati per il test d'attività 6 flaconi 4 R contenenti il principio attivo proteico. Ciascun flacone è stato ricostituito con 5 ml di buffer citrato (10mM a pH 6.5) nel caso di prove di liofilizzazione; mentre con 4 ml di buffer nel caso di prove di congelamento. Dopo aver miscelato adeguatamente sono stati prelevati da ciascun campione 200  $\mu$ L e aggiunti insieme a 10 ml di buffer in 6 flaconi 10 R corrispondenti (24 $\times$ 60 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piobino Dese, Italia), (Figura 2.6).



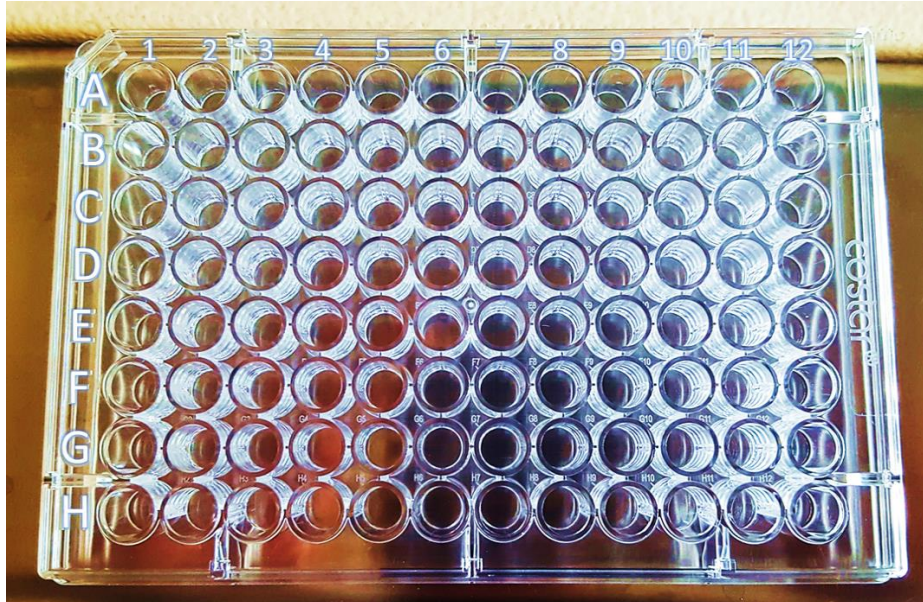
**Figura 2.6-** Metodica di diluizione 6 flaconi 4R in prima fila; 6 Flaconi 10 R corrispondenti in seconda fila.

Dopo di che è stata preparata la piastra (Assay Plate, 3370, Corning Incorporated, USA) composta da 96 pozzetti disposti in 12 colonne e 8 righe (Figura 2.7). I pozzetti sono stati riempiti sempre con la stessa metodica:

- Nella prima fila (A) sono state aggiunte, ognuna in pozzetti differenti, le quantità di 0  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 6  $\mu$ L, 8  $\mu$ L e 10  $\mu$ L di 1.25 mM NADH Standard. Il volume di tali singoli pozzetti è stato portato a 50  $\mu$ L con l'aggiunta di Assay Buffer. La prima riga è stata dedicata, ogni qualvolta vi erano dei test d'analisi, alla costruzione della retta di taratura del NADH Standard.
- Le file successive sono state dedicate all'analisi delle prove effettuate. Ogni fila difatti corrispondeva ad una specifica prova di liofilizzazione o congelamento. In ogni pozzetto della fila sono stati aggiunti 50  $\mu$ L prelevati da ciascun flacone 10 R, avente

una soluzione al 0.01 mg/ml di LDH. Per ogni flacone sono stati effettuati due prelievi e riempiti 2 pozzetti.

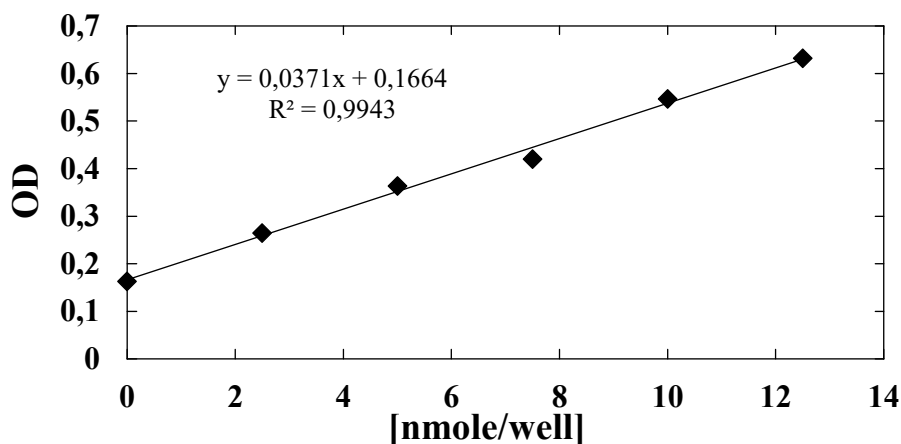
- Come ultimo step in ogni singolo pozzetto sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di Master Reaction Mix.



**Figura 2.7-** Immagine piastra; Fila A dedicata alla retta di taratura del NADH Standard; Dalla seconda fila in giù, pozzetti dedicati all'analisi d'attività enzimatica delle prove di congelamento e liofilizzazione.

Dopo di che una volta preparata la piastra con tale metodica è stata inserita all'interno di uno spettrometro (Multiskan Go, Thermo Fischer Scientific, USA). Sono stati misurati i valori di assorbanza per ciascun pozzetto a 450 nm ogni 5 minuti per 30 minuti. Durante l'analisi la piastra è stata tenuta ad una temperatura di 37 °C e al buio, affinché avvenisse la reazione di ossidoriduzione del NAD in NADH, catalizzata dal LDH.

Una volta ottenuti i valori d'assorbanza per prima cosa si è costruita la retta di taratura di NADH standard, riportando sull'asse delle ascisse le quantità di NADH (nmole/well) inserite nei pozzetti pari a 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5. Mentre in ordinate vengono riportati i corrispettivi valori d'assorbanza (Figura 2.8).



**Figura 2.8-** Retta di taratura NADH Standard

In seguito è stata misurata la differenza tra il valore d'assorbanza al tempo finale con il valore d'assorbanza al tempo iniziale di ogni singolo pozzetto analizzato tramite spettrometro.

$$\Delta A_{450} = (A_{450})_{finale} - (A_{450})_{iniziale} \quad (2.1)$$

Per determinare la quantità di NADH generata in ogni singolo pozzetto appartenente ad una specifica prova è stata comparata la differenza  $\Delta A_{450}$  di ogni singolo campione con la differenza tra il valore finale e iniziale di assorbanza ottenuti dalla retta di taratura del NADH Standard. Sono stati così determinati attraverso l'equazione (2.2) i valori di NADH (nmole) generato in ogni singolo pozzetto tra il tempo finale e iniziale d'analisi (B).

$$B = \frac{(\Delta A_{450})_{pozzetti}}{(\Delta A_{450})_{Standard}/12.5} \quad (2.2)$$

Una volta identificata tale quantità è stato determinato il valore di attività di LDH in ogni singolo pozzetto attraverso la seguente equazione.

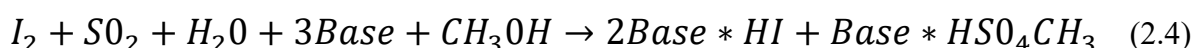
$$LDH \text{ Activity} = \frac{B \times \text{Sample Dilution Factor}}{(\text{Reaction Time}) \times V} \quad (2.3)$$

- B è la quantità (nmole) di NADH descritta in equazione (2.2);
- “Sample Dilution Factor” è il fattore di diluizione utilizzato per i nostri campioni pari a 250;
- “Reaction Time” corrisponde al tempo in cui è avvenuta la reazione chimica di conversione da NAD in NADH pari a 30 min;
- V corrisponde al volume di campione aggiunto all' interno dei pozzetti pari a 0.05 ml.

L'attività di LDH in tutte le prove è stata riportata come [nmole/min/ml] pari all'unità di misura internazionale [milliunit/mL]. Un'unità di LDH è definita come la quantità di enzima capace di catalizzare la conversione di lattato in piruvato e di generare 1.0  $\mu$ mole di NADH per minuto alla temperatura di 37 °C.

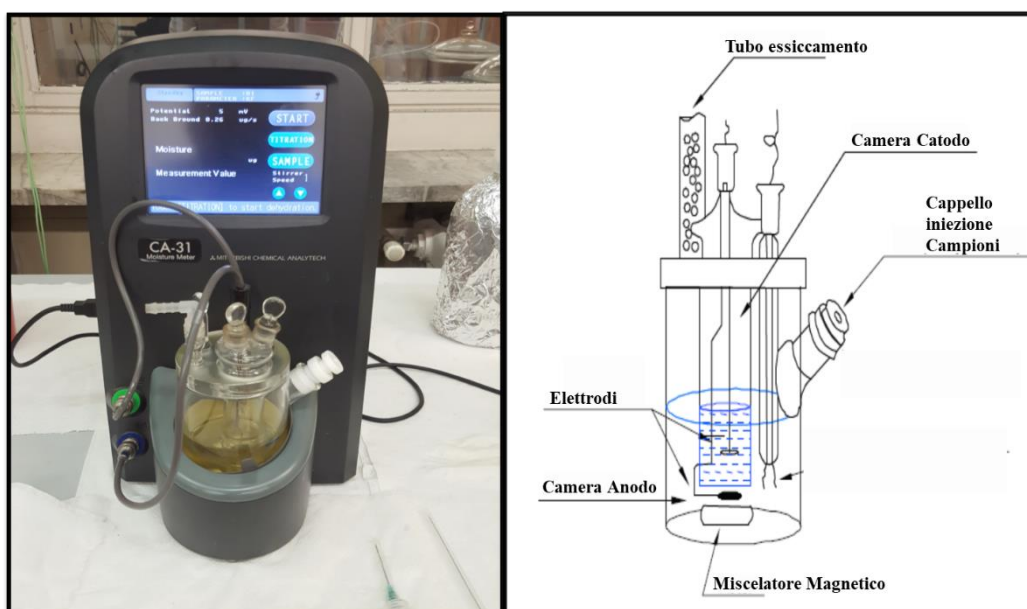
## 2.5 Analisi del contenuto residuo d'acqua (Karl Fischer Titration)

La titolazione Karl Fischer è uno dei metodi più utilizzati per determinare delle tracce d'acqua nei campioni. In ambito farmaceutico tale metodo chimico analitico è in grado di determinare il residuo d'umidità specifico all'interno dei prodotti liofilizzati. La tecnica è stata inventata dal chimico tedesco da cui prende il nome Karl Fischer nel 1935. Tale metodica consiste nell'utilizzo di un reagente che reagisce in maniera quantitativa e selettiva con l'acqua, per misurare il contenuto d'umidità residuo. Il reagente in questione è costituito generalmente da iodio, biossido di zolfo, una base organica e un alcool (normalmente metanolo). Ci possono essere due criteri applicativi del metodo, il primo prende il nome di titolazione coulometrica, mentre il secondo consiste nella titolazione volumetrica. La reazione (2.4) illustrativa della metodica è comune in entrambe le configurazioni.



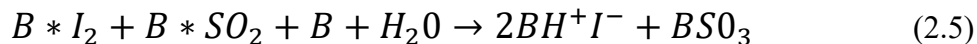
### Titolazione Coulometrica

Per l'analisi dell'umidità residua all'interno dei campioni liofilizzati, in questo progetto di tesi è stata utilizzata la titolazione coulometrica. L'apparecchiatura utilizzata (CA-31, Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech, Japan) è composta da uno scompartimento principale contenente l'anodo immerso in una soluzione. Quest'ultima consiste come detto precedentemente in un alcool (metanolo), una base (B), biossido di zolfo e iodio. La cella di titolazione è composta anche da una piccola sezione contenente un catodo (di platino) immerso nella soluzione anodica dello scompartimento principale. I due settori sono separati da una membrana permeabile ionica (Figura 2.9).



**Figura 2.9-** Sulla sinistra immagine Karl Fischer (apparecchiatura DISAT); sulla destra illustrazione componentistiche immagine modificata (Koch, et al., 2007)

La reazione in soluzione anodica una volta aggiunta una certa quantità d'acqua, consiste nell'ossidazione del biossido di zolfo da parte dello iodio. Una mole di iodio viene consumata per ogni mole d'acqua (reazione 2.5), in altre parole, 2 moli di elettroni vengono consumate per una mole d'acqua. Ogni qualvolta che lo iodio viene ossidato, contemporaneamente viene ricostituito al catodo (reazione 2.6) grazie alla corrente fornita attraverso il circuito elettrico.



La quantità d'acqua contenuta all'interno del campione può essere calcolata attraverso la misura della carica necessaria, durante l'intera analisi, per generare lo iodio al catodo. Lo strumento utilizzato restituisce direttamente la quantità d'acqua in  $\mu\text{g}$ , considerando che 10 mg  $H_2O$  corrispondono a 10.71 Coulomb.

### Protocollo di analisi

I test d'umidità specifica sono stati svolti su 5 flaconi per ogni ciclo completo di liofilizzazione effettuato, ovvero 1b\*,2b\*,3b\*,1s\*,2s\*,3s\* e 1b\*\*,2b\*\*,3b\*\*,1s\*\*,2s\*\*,3s\*\*. Le prove citate riguardano:

- I cicli batch e a flaconi sospesi con temperatura di nucleazione differente (paragrafo 2.3);
- I cicli di liofilizzazione batch e a flaconi sospesi a differente percentuale di eccipiente (paragrafo 2.3);

La procedura utilizzata per l'analisi del residuo di umidità all'interno dei flaconi, attraverso l'utilizzo del metodo Karl Fischer Titration, consiste in diversi step citati in seguito:

- Operazione iniziale: accendere lo strumento e impostare la velocità del miscelatore a 3 rpm/min. Aspettare finché la velocità di titolazione non sia al di sotto del valore di 0.3  $\mu\text{g/s}$ ;
- Step 1: Prima di iniziare ogni ciclo di liofilizzazione, è stato pesato ogni flacone (vuoto) in cui successivamente si è inserita la soluzione di saccarosio per effettuare l'analisi d'umidità residua. A fine di ciascuna prova i cinque flaconi con all'interno il prodotto essiccato sono stati ripesati. Facendo la differenza tra il peso dei flaconi contenente il prodotto essiccato e il peso dei flaconi vuoti è stato ottenuto il valore della massa solida essiccata ( $g_{\text{solido}}$ );
- Step 2: attraverso una siringa è stata prelevata una certa quantità di solvente dalla camera di titolazione. Dopo di che è stata inserita una quantità di solvente pari a 2 ml all'interno dei flaconi contenente il prodotto essiccato. Il tutto è stato miscelato, scuotendo leggermente i flaconi, completando così il processo di solubilizzazione del prodotto. Il flacone contenente la soluzione è stato pesato per ottenere il valore della massa del solvente iniettato (S);
- Step 3: La soluzione all'interno del flacone, descritta nello step 2, è stata prelevata con una nuova siringa. Tale operazione è stata svolta in maniera da non creare bolle d'aria

all'interno della siringa. Quest'ultima è stata pesata, tarando la bilancia al suo valore di peso. In fine la soluzione è stata iniettata all'interno della cella di titolazione, e la siringa vuota ripesata per ottenere la massa di soluzione inserita all'interno della cella (C);

- Step 4: l'ultimo passaggio consiste nell'attendere la fine della fase di titolazione iniziata nello step 3, dopo aver inserito la soluzione all'interno della cella. Tale passaggio corrisponde nell'attendere che la velocità di titolazione scenda al di sotto di 0.3 µg/s. In seguito si è annotato il valore della massa d'acqua(E), espressa in µg, contenuta nel campione analizzato.

Una volta ricavati, dall'analisi al Karl Fischer, determinati valori attraverso gli step appena descritti, è stato calcolato il valore percentuale d'umidità residua per ciascun flacone. In primis si è calcolata la massa d'acqua totale in ciascun campione attraverso l'equazione (2.7):

$$g_{H2Ototale} = \frac{E * 10^{-6} * (B + g_{solid})}{C} \quad (2.7)$$

Una volta calcolato tale valore per i cinque flaconi appartenenti ad una specifica prova di liofilizzazione, sono stati ricavati i valori percentuali di umidità ("moisture") residua specifica attraverso l'equazione (2.8), espressa come:

$$\%moisture = \frac{g_{H2Ototale}}{g_{solid} - g_{H2Ototale}} * 100 \quad (2.8)$$

## 2.6 Analisi dello Scambio Termico Durante le Prove di Congelamento

Per meglio capire quelle che sono le differenze tra i due protocolli utilizzati in questo lavoro di tesi (configurazione batch e a flaconi sospesi), sono state svolte delle analisi riguardanti lo scambio termico nelle fasi di raffreddamento e congelamento. Si sono a tal fine impostati dei bilanci di calore.

Le informazioni essenziali utilizzate per effettuare le analisi di scambio termico sono:

- Le variabili riguardanti il prodotto sottoposto a congelamento, quali:
  - la temperatura  $T_p$ , misurata tramite termocoppie;
  - la massa  $m_p$ , ricavata una volta note la densità e il volume della soluzione utilizzata;
  - il calore specifico  $C_p$ , che cambia a seguito della conversione dell'acqua in ghiaccio;
  - la frazione di ghiaccio  $X_{ghiaccio}$  che si forma (all'equilibrio termodinamico) in funzione della temperatura del prodotto. Tale informazione si può ottenere dal diagramma di fase acqua-saccarosio.
- I parametri relativi ai due protocolli utilizzati (batch e a flaconi sospesi):
  - Coefficienti di scambio  $U$ ;
  - Profilo di temperatura del ripiano  $T_R$ , durante la fase di raffreddamento e congelamento.

### Fase di Raffreddamento

La temperatura della soluzione in questa fase viene ridotta fino al valore a cui si desidera far avvenire il processo di nucleazione (differente per le varie prove, come mostrato in Tabella 2.4). Il prodotto in tale stadio del processo non subisce alcuna variazione di fase, rimanendo in stato liquido. Analizzando i profili termici di prodotto e ripiano in questa fase si è ricavato il coefficiente globale di scambio termico ( $U$ ) relativo alla due configurazioni prese in considerazione. Tale valore è stato ricavato risolvendo la seguente equazione di bilancio:

$$m_p C_{p,liq} \frac{dT_p}{dT} = U(T_R(t) - T_P(t)) \quad (2.9)$$

L'Equazione (2.9) descrive un bilancio di calore, in cui a sinistra troviamo il flusso di calore sensibile del prodotto liquido durante la fase di raffreddamento. A destra dell'equazione viene invece descritto il flusso termico che avviene tra il ripiano e i campioni soggetti a raffreddamento. La massa del prodotto è stata ricavata utilizzando, il volume della soluzione in ciascun flacone e la densità, approssimata, per semplicità, al valore dell'acqua pura. I parametri utilizzati, insieme al calore specifico in fase liquida sono riassunti nella Tabella 2.9.

**Tabella 2.9- Parametri utilizzati nell'Equazione (2.9)**

$\rho_{liq}$ [kg/m <sup>3</sup> ]	$V_{liq}$ [m <sup>3</sup> ]	$C_{p,liq}$ [J/kg/K]	$m_p$ [kg]
1000	10 <sup>-6</sup>	4186	0.001

Attraverso il bilancio di calore dell'Equazione (2.9) si sono ricavati i coefficienti di scambio termico globale per ciascuna prova di congelamento. Successivamente si è effettuata la media di tali valori per ottenere dei coefficienti globali per le due configurazioni batch ( $U_{batch}$ ) e a flaconi sospesi ( $U_{suspended}$ ).

I risultati dei valori relativi ai coefficienti di scambio termico globali corrispettivi alle due modalità di processo ( $U_{batch}$ ,  $U_{sospeso}$ ), sono illustrati nel paragrafo 3.7 del capitolo 3.

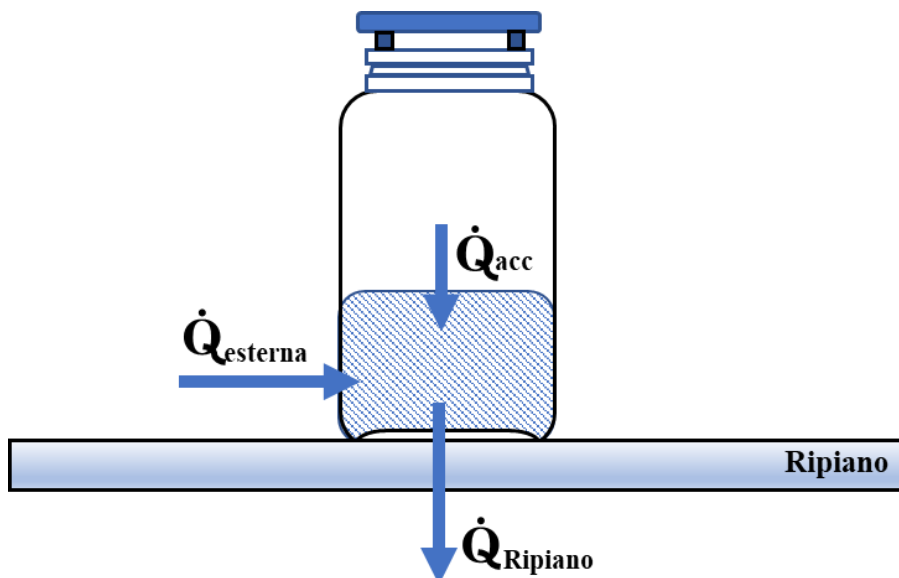
### Fase di mantenimento prima della nucleazione

In questa fase il prodotto non è soggetto a variazione di temperatura, e non subisce transizioni di fase. Pertanto, all'equilibrio, esso dovrebbe assestarsi alla stessa temperatura del ripiano. Ciò non avviene, a cause dell'esistenza di una potenza termica spuria fornita dalle pareti del liofilizzatore per irraggiamento, e dell'aria circostante tramite convezione naturale, e che può essere quantificata in questa fase tramite l'Equazione,

$$\dot{Q}_{esterna} = U(T_P - T_R) \quad (2.10)$$

### Fase di congelamento

Le analisi termiche riguardanti la fase di congelamento sono state effettuate prendendo in considerazione, come istante iniziale di tempo, il momento successivo al fenomeno di nucleazione. Dopo tale avvenimento infatti si verifica l'accrescimento dei cristalli di ghiaccio. In particolare si è focalizzata l'attenzione su quale fosse la potenza di calore ( $\dot{Q}_{acc}$ ) effettiva generata dal fenomeno di accrescimento, per entrambe le configurazioni. Per fare ciò si è impostato un bilancio di calore in Equazione (2.11), in cui sono inclusi tutti i flussi termici coinvolti nella fase di congelamento (Figura. 2.11).



*Figura 2.11 - Rappresentazione dei flussi termici entranti ed uscenti, per il caso della configurazione batch, durante la fase di congelamento*

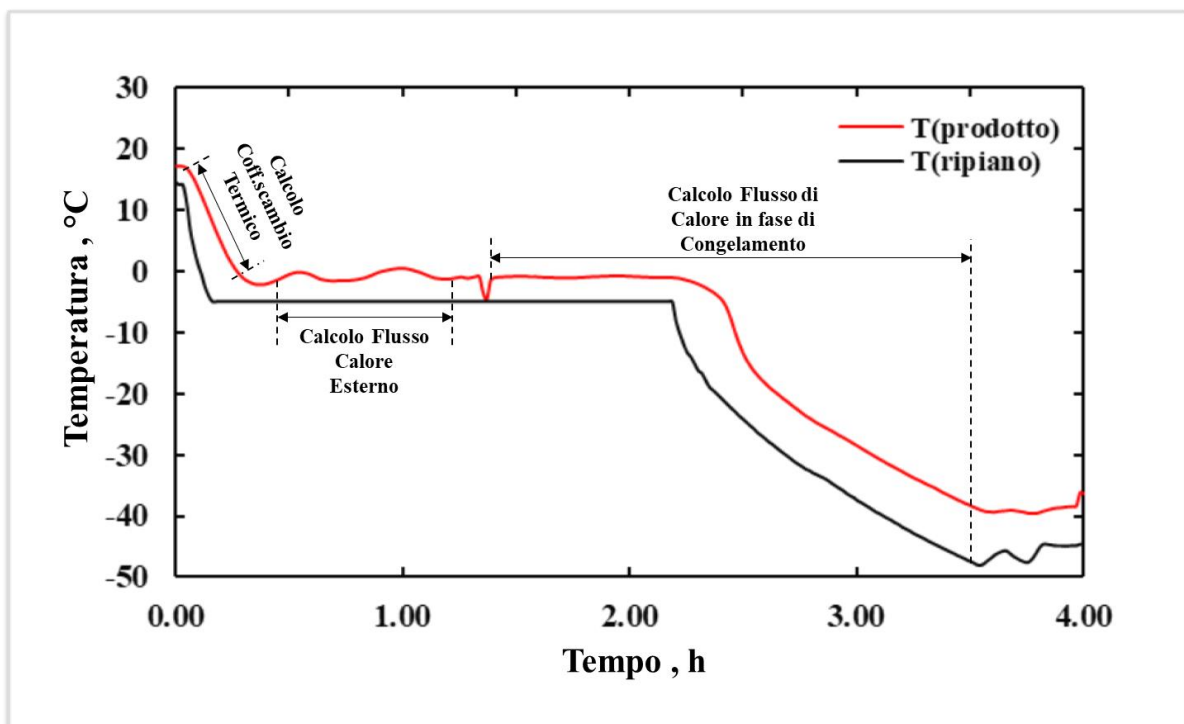


$$\dot{Q}_{acc} = \dot{Q}_{Ripiano} - \dot{Q}_{esterna} + m_p C_P (X_{ghiaccio}) \frac{dT_p}{dt} \quad (2.11)$$

In cui la  $\dot{Q}_{Ripiano}$  e  $\dot{Q}_{esterna}$  vengono descritte rispettivamente tramite le Equazioni (2.12) e (2.10)

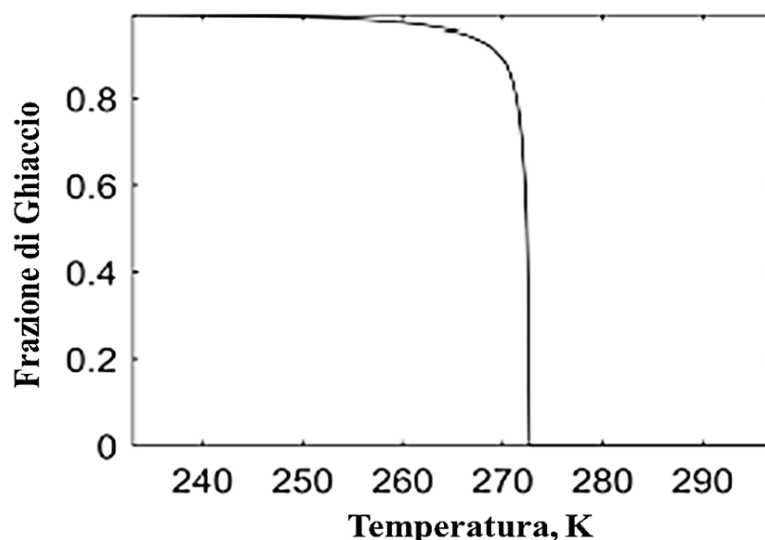
$$\dot{Q}_{Ripiano} = U(T_p(t) - T_R(t)) \quad (2.12)$$

$\dot{Q}_{Ripiano}$ , illustrato in equazione (2.12), rappresenta il flusso termico di calore scambiato tra flacone e ripiano durante la fase di congelamento. Gli intervalli di tempo in cui si sono calcolati i differenti valori citati possono essere meglio identificati mediante la rappresentazione di un profilo termico riguardante una delle prove di congelamento effettuate (Figura 2.11).



**Figura 2.11**-Profilo termico durante la prova di congelamento batch a  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -5^\circ\text{C}$

In equazione (2.11) si tiene conto anche del termine di calore sensibile dovuto alla variazione della temperatura del prodotto durante la fase di congelamento. In questa fase il calore specifico è funzione della frazione di ghiaccio in soluzione, a sua volta dipendente dalla temperatura. La variazione della frazione di ghiaccio  $X_{ghiaccio}$  in funzione della temperatura è stata ricavata da (Arsiccio, et al., 2019) ed è mostrata in Figura (2.10). Il calore specifico in fase di congelamento viene pertanto espresso mediante l'equazione (2.13).



**Figura 2.10-** Frazione di ghiaccio in funzione della temperatura. Immagine modificata da (Arsiccio, et al., 2019)

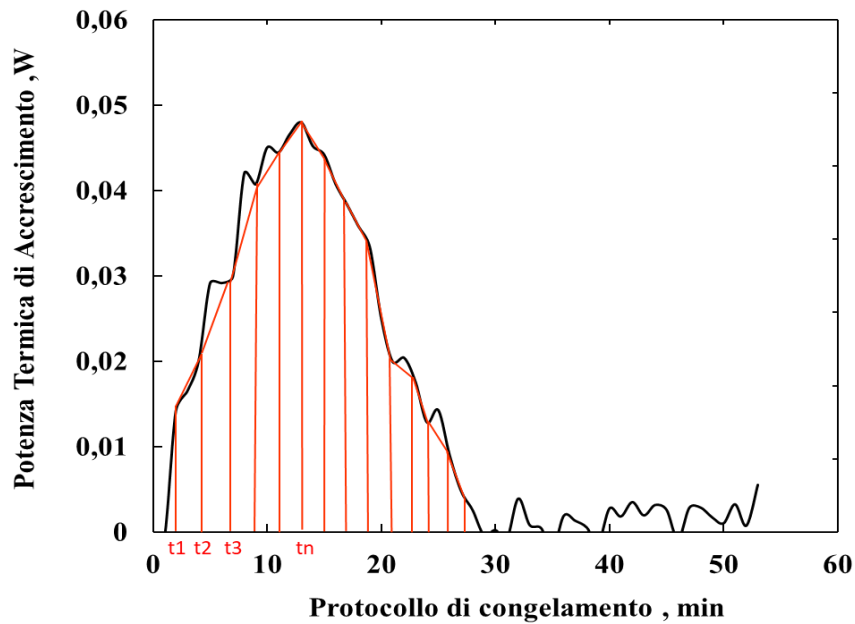
Il calore specifico in fase di congelamento viene pertanto espresso mediante l'equazione (2.13).

$$C_P(X_{ghiaccio}) = C_{P_{ghiaccio}} * X_{ghiaccio}(T_P) + C_{P_{liq}} * (1 - X_{ghiaccio}(T_P)) \quad (2.13)$$

Integrando il flusso di calore  $\dot{Q}_{acc}$  (in Equazione 2.11) nel tempo si ottiene la quantità di calore totale scambiata in fase di congelamento  $\dot{Q}_{acc}$ . Tale quantità è stata calcolata mediante il metodo dei trapezi composti, illustrato in Equazione (2.14).

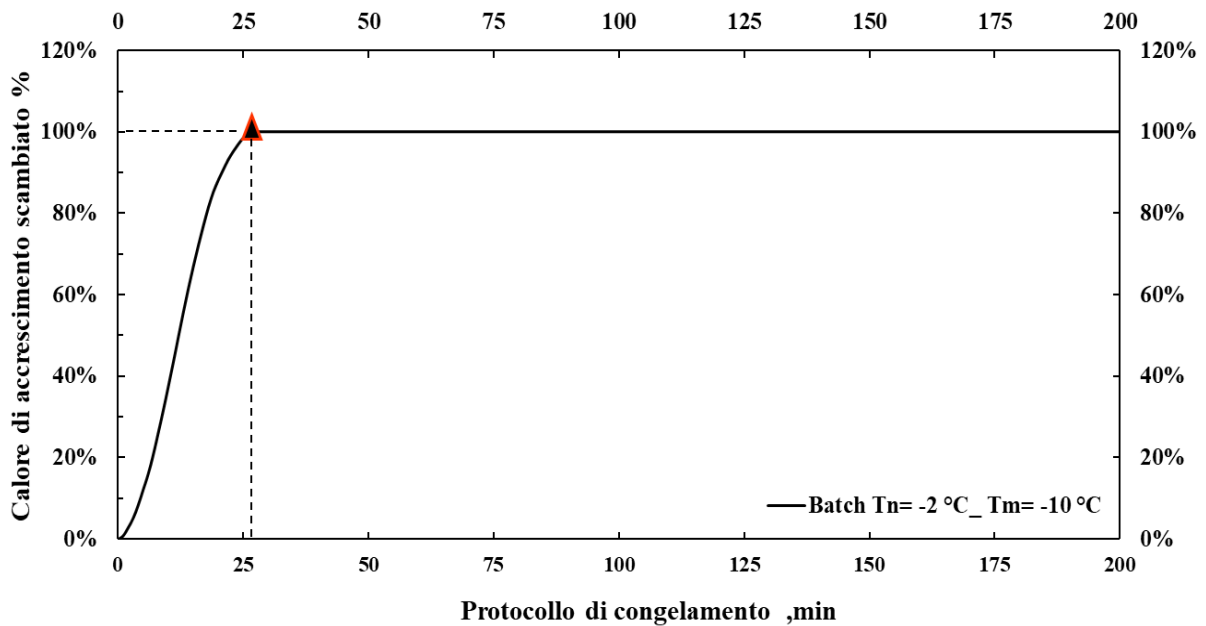
$$Q_{acc} = \frac{(b-a)}{2} \sum_{i=1}^n [\dot{Q}_{acc}(t_i) + \dot{Q}_{acc}(t_{i-1})] \quad (2.14)$$

In Equazione (2.14) il termine (b-a) rappresenta il passo temporale di misurazione della temperatura da parte delle termocoppie in soluzione, corrispondente ad 1 minuto. La sommatoria comprende tutti i flussi termici calcolati a partire dalla nucleazione, e fino al raggiungimento della quantità di calore necessaria per congelare completamente il prodotto. Una rappresentazione grafica dell'equazione (2.14) è illustrata in Figura (2.11).



**Figura 2.11-** Potenza termica di accrescimento calcolata per una prova batch durante il processo di congelamento a  $T_n = -2\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10\text{ }^\circ\text{C}$ . Il metodo dei trapezi composto è stato usato per il calcolo della quantità di calore scambiato.

Per identificare l'istante di tempo al quale avviene il completo congelamento dei prodotti si è diagrammata la quantità di calore di accrescimento scambiato, in ogni singola prova svolta, in funzione del tempo (protocollo di congelamento post nucleazione utilizzato). Graficamente si è individuato in ogni curva l'istante in cui avviene il cambiamento di pendenza (Figura 2.12), corrispondente al fatto che la soluzione risulta essere completamente congelata. La quantità di calore è stata normalizzata rispetto al valore in cui si registra tale variazione di pendenza.



**Figura 2.12-** Quantità di calore di accrescimento scambiato durante una prova batch a  $T_n = -2\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10\text{ }^\circ\text{C}$ . Il triangolo nero con bordo rosso rappresenta il punto di fine del congelamento.

## 2.7 Analisi della fase di essiccamento primario

### Analisi del tempo di essiccamento primario dei prodotti

Per le analisi del tempo di sublimazione in ciascuna prova di liofilizzazione svolta, si è preso in considerazione la rate di sublimazione descritto nel paragrafo 1.2 del capitolo 1 e definito dall'equazione (1.2). Un'ipotesi fatta consiste nel considerare la pressione parziale d'acqua simile alla pressione registrata in camera attraverso lo SCADA ( $p_{w,c} \sim p_c$ ). Si è calcolata la tensione di vapore del ghiaccio durante tutti gli istanti di tempo della fase di essiccamento primario. Quest'ultima viene espressa dall'equazione (2.16) ricavata da (Z.Jacobson, 2005), dove T rappresenta la temperatura del prodotto congelato registrata mediante termocoppie ogni minuto.

$$p_{w,i} = 6.112 * \exp \left[ 4648 \left( \frac{1}{273.15} - \frac{1}{T(t)} \right) - 11.64 \ln \left( \frac{1}{T(t)} \right) + 0.02265(273.15 - T(t)) \right] \quad (2.16)$$

Si è confrontato in tutto l'arco temporale del processo di essiccamento primario la tensione di vapore del ghiaccio con il valore di pressione in camera  $p_c$ . Come inizio del processo di sublimazione si considera il momento di tempo in cui la tensione di vapore superficiale del ghiaccio supera la pressione in camera, durante la fase di essiccamento primario. Tale condizione viene espressa dalla disequazione,

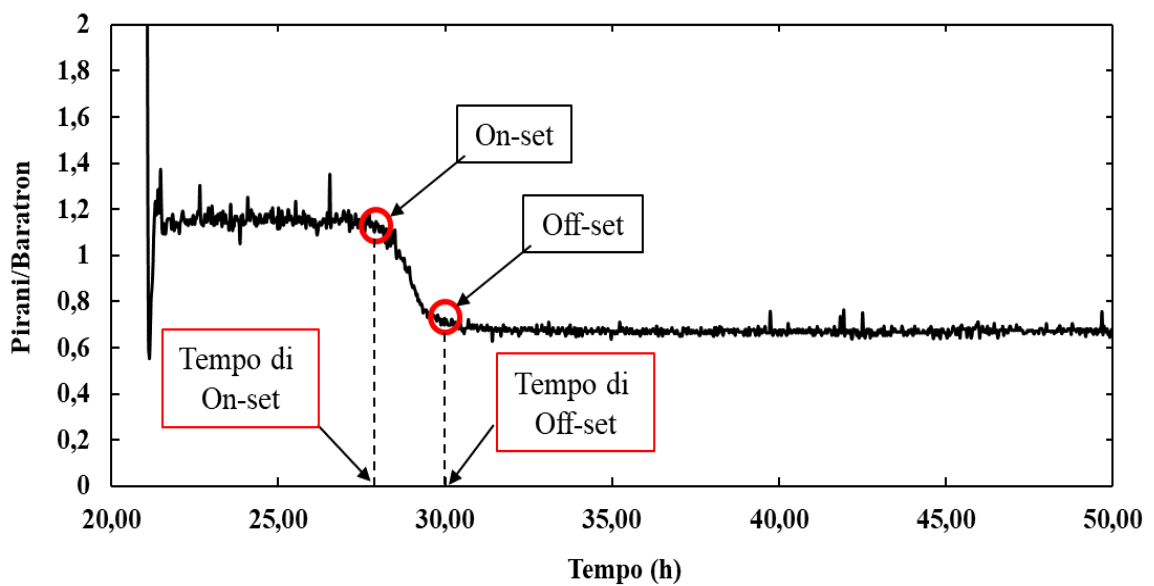
$$p_{w,i} > p_c \quad (2.17)$$

Come fine del fenomeno di sublimazione nelle prove svolte, si è considerato il momento di tempo corrispondente al raggiungimento della condizione di off-set, che verrà descritta nel paragrafo successivo e illustrata in Figura 2.13.

Così facendo il tempo di sublimazione dei prodotti nelle varie prove di liofilizzazione è stato calcolato come, la differenza fra momento temporale in cui si verifica la condizione descritta in equazione 2.17 e il raggiungimento della condizione di off-set (Figura 2.13).

### Analisi valori di Off-set e On-set

Per quanto riguarda la valutazione del fattore di omogeneità tra i flaconi di ogni singola prova. Si sono valutati quelli che sono i valori dei tempi di on-set e off-set, prendendo in considerazione la loro differenza. L'on-set rappresenta il momento temporale in cui nella maggior parte dei flaconi presenti in camera il processo di sublimazione è terminato. Invece L'off-set viene considerato l'istante di tempo in cui in tutti i flaconi il fenomeno di sublimazione è terminato. Questi due valori sono determinati graficamente, riportando la variazione del rapporto di pressione tra Pirani e Baratron in funzione del tempo (Figura 2.13).

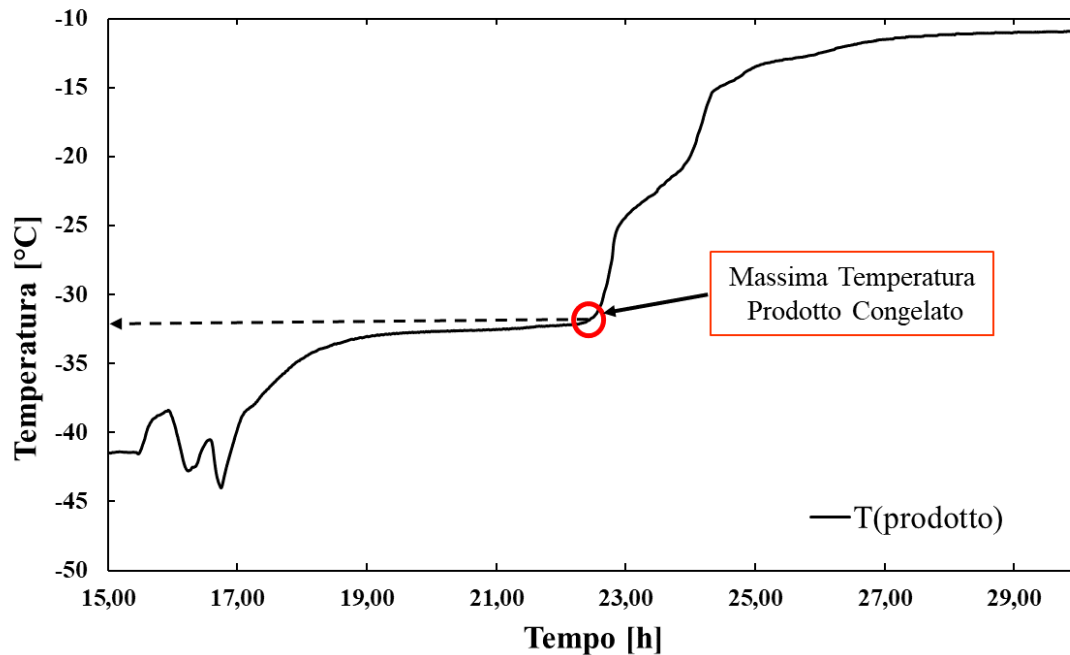


**Figura 2.13-** *Rappresentazione valori on-set e off-set on una curva di rapporto Pirani Baratron per una prova a flaconi sospeso con  $T_n = -5^\circ\text{C}$  al 5% di saccarosio in peso di saccarosio.*

Mediante la valutazione grafica come mostrato in Figura 2.13 sono stati determinati i due valori di tempo in cui si sono raggiunte le condizioni di Off-set e On-set durante la fase di essiccamento primario. Dopodiché, per ogni singola prova di liofilizzazione effettuata, si sono riportati i risultati riguardanti la differenza fra i due tempi. Quest'ultima rappresenta un indice di omogeneità e uniformità dei prodotti finali processati nei differenti cicli.

### Analisi della temperatura massima del prodotto congelato

Attraverso i dati ricavati dalle termocoppie si valuta la massima temperatura del prodotto congelato. Tale valore in ogni prova di liofilizzazione è stato valutato in maniera grafica andando a rappresentare quella che è la variazione di temperatura dei campioni nel tempo, durante l'essiccamento primario (Figura 2.14).



**Figura 2.14-** Profilo termico della prova a flaconi in sospenso  $T_n = -2^\circ\text{C}$   $T_m = -5^\circ\text{C}$  durante essiccamento primario; Massima temperatura prodotto congelato ricavata graficamente.

Tale valore rappresentato in Figura 2.14 è valutato tenendo conto della variazione di pendenza del profilo termico di temperatura del prodotto durante il processo di essiccamento primario. La variazione è dovuta al fatto che la termocoppia non registra più una temperatura di un prodotto solido in cui è presente ghiaccio ma bensì registra un valore in una porzione essiccata. Questo fenomeno è indice dello svolgimento del processo di sublimazione. I dati di massima temperatura del prodotto congelato sono confrontati con i dati relativi alla temperatura di collasso, per ricavare informazioni sull'integrità strutturale dei campioni nelle diverse prove (Pikal, et al., 1990).

Tale parametro di processo è stato analizzato in ogni prova di liofilizzazione effettuata nel lavoro di tesi, i cui protocolli e formulazione sono riassunti nel capitolo 2 paragrafo 2.3 dedicato alle prove di essiccamento.



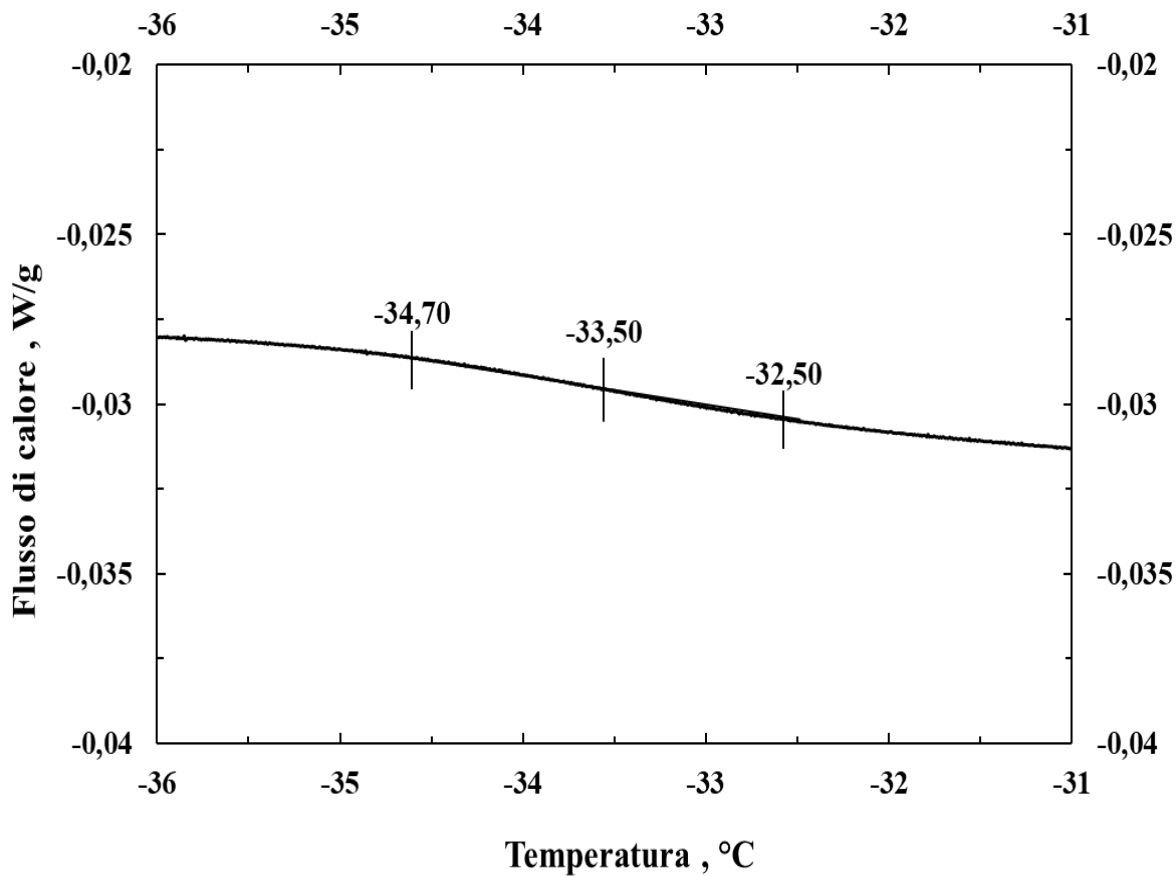
## 3. Risultati

In questa sezione si riportano i risultati sperimentali riguardanti il presente progetto tesi. I dati analizzati riguardano prove di congelamento e di liofilizzazione svolte con i due protocolli di processo, batch e a flaconi in sospeso. I parametri valutati e già illustrati nel capitolo 2, riguardante i metodi risultano essere: caratterizzazione termica delle soluzioni utilizzate nelle diverse prove sperimentali; tempi di essiccamento primario e valori di offset e onset; analisi dell'attività proteica residua usando l'LDH come proteina modello; analisi dello scambio termico durante la fase di congelamento; infine, dati relativi al contenuto residuo di acqua dei prodotti liofilizzati. Per ciascun parametro, si confrontano i risultati osservati per i due protocolli di carico, batch e a flaconi sospesi. L'obiettivo risiede nel valutare se ci siano differenze di comportamento tra le due configurazioni, mettendo in evidenza quali siano i punti di forza di una configurazione di carico quale quella dei flaconi in sospeso rispetto a un sistema batch, e quali invece i parametri in cui quest'ultimo risulta essere ancora più efficiente.

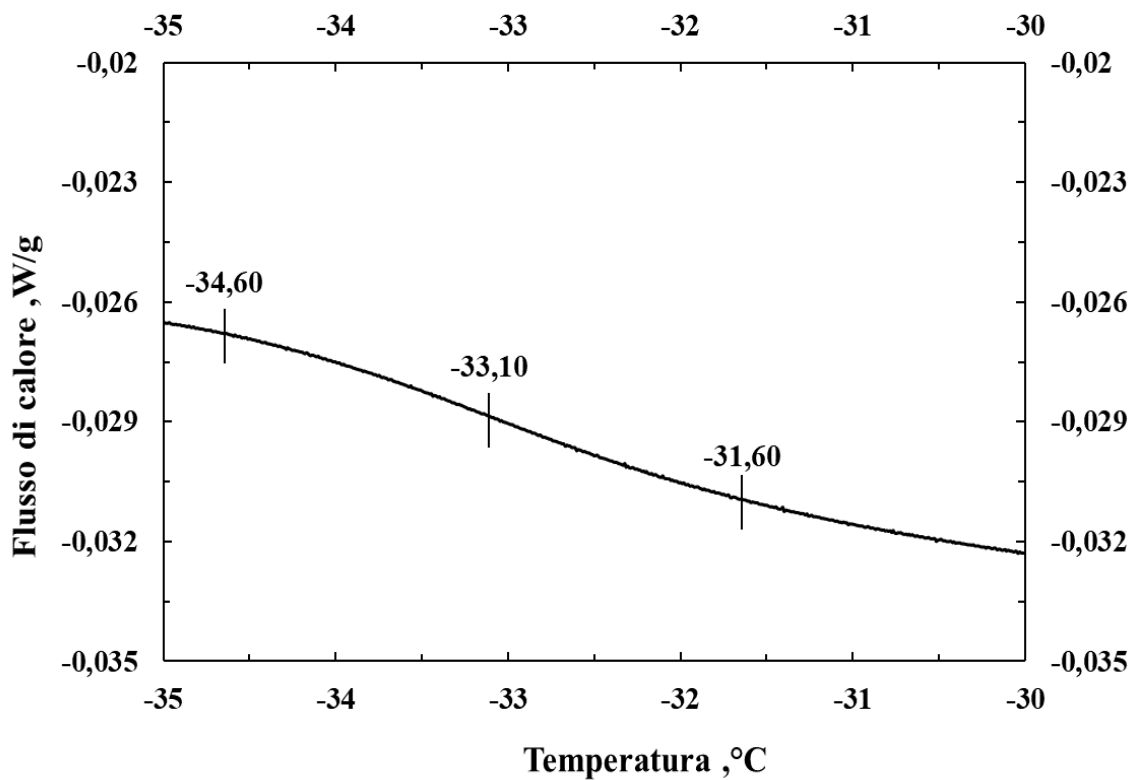
### 3.1 Caratterizzazione termica via DSC

La calorimetria a scansione differenziale (differential scanning calorimetry, DSC) permette di individuare le temperature in cui avvengono eventuali cambiamenti di fase come ad esempio può essere la transizione vetrosa in una soluzione contenete un eccipiente. Nelle Figure 2.15, 2.16, 2.17, si riportano i risultati ottenuti dalle analisi delle soluzioni a differente concentrazione di saccarosio riportate in Tabella 2.1.

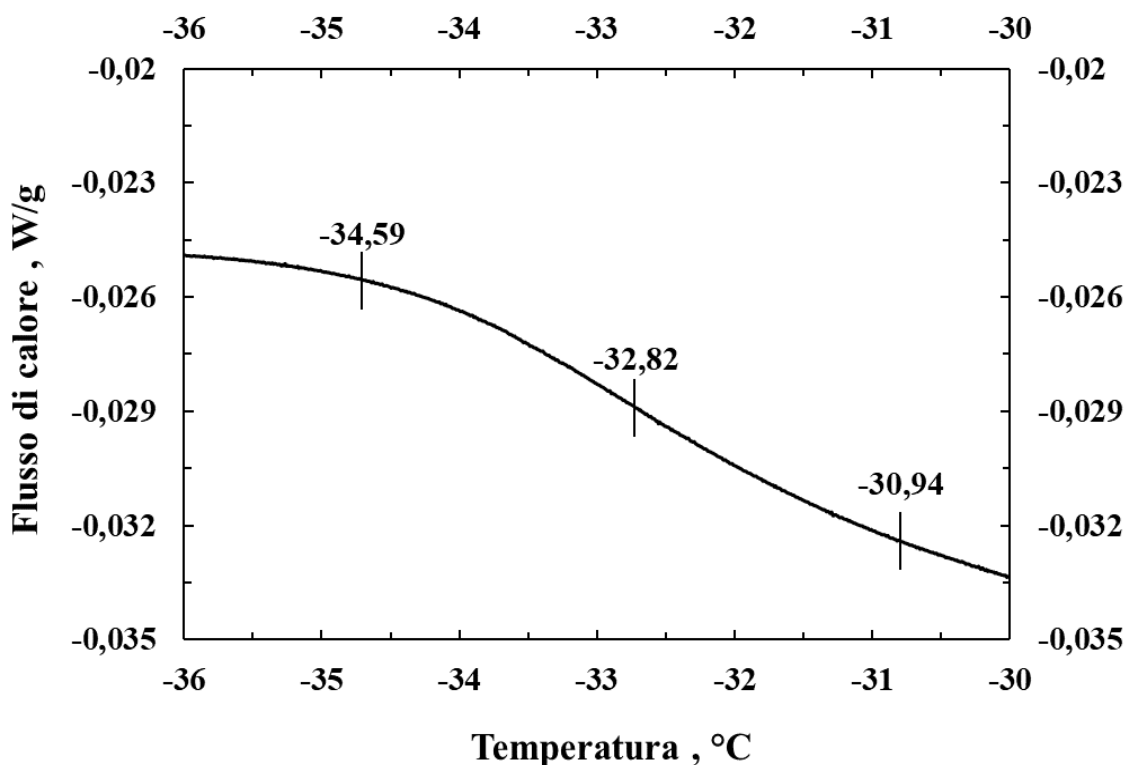




*Figura 3.1 - Risultati analisi DSC soluzione di saccarosio 5% w/w*



*Figura 3.2 - Risultati analisi DSC soluzione saccarosio 10% w/w*



*Figura 3.3- Risultati analisi DSC soluzione saccarosio 15% w/w*

Si riassumono in Tabella 3.1 i risultati ottenuti dall'analisi calorimetrica in cui vengono riportati i valori della temperatura di transizione  $T_g$  nelle differenti soluzioni.

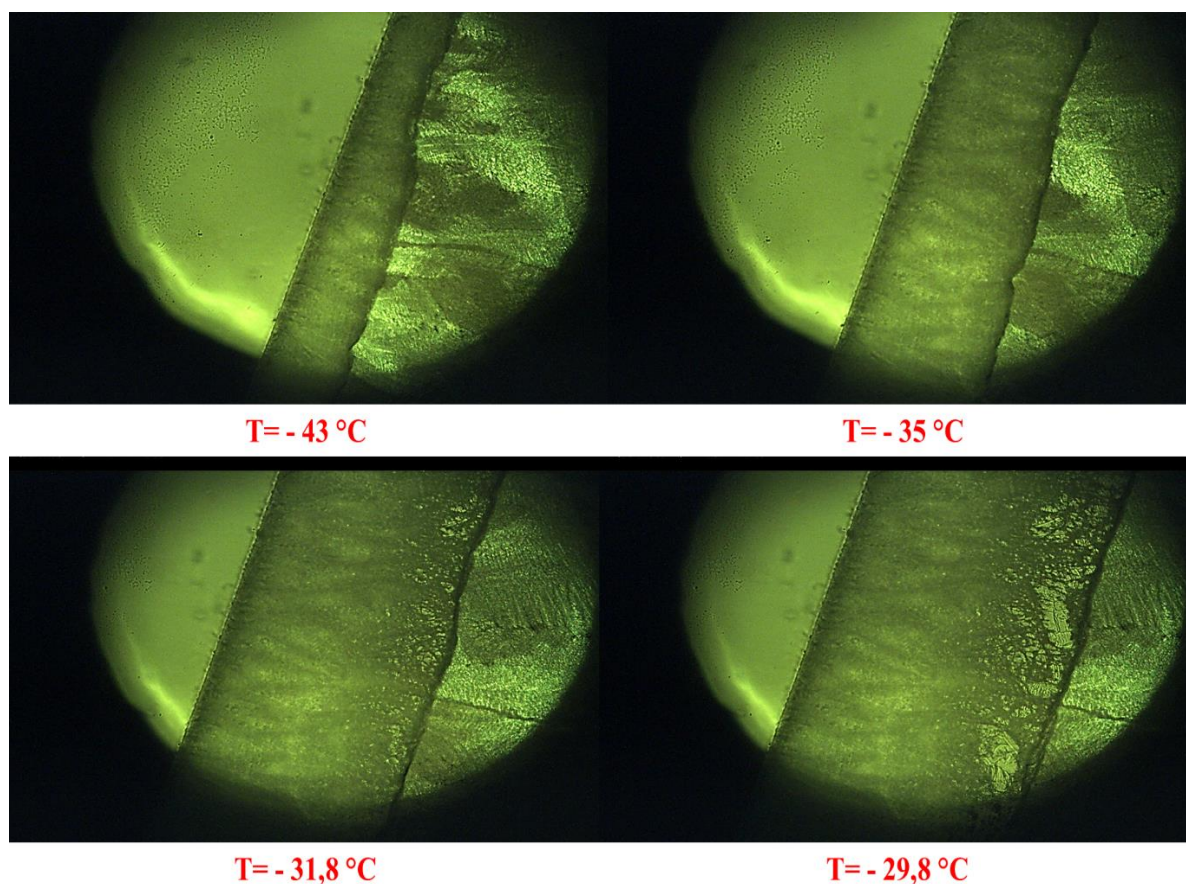
*Tabella 3.1- Valore di temperatura di transizione nelle differenti soluzioni*

Nome	Formulazione	$T_g$ (°C)
A	Saccarosio 5%	- 33.50
B	Saccarosio 10%	-33.10
C	Saccarosio 15%	-32.82

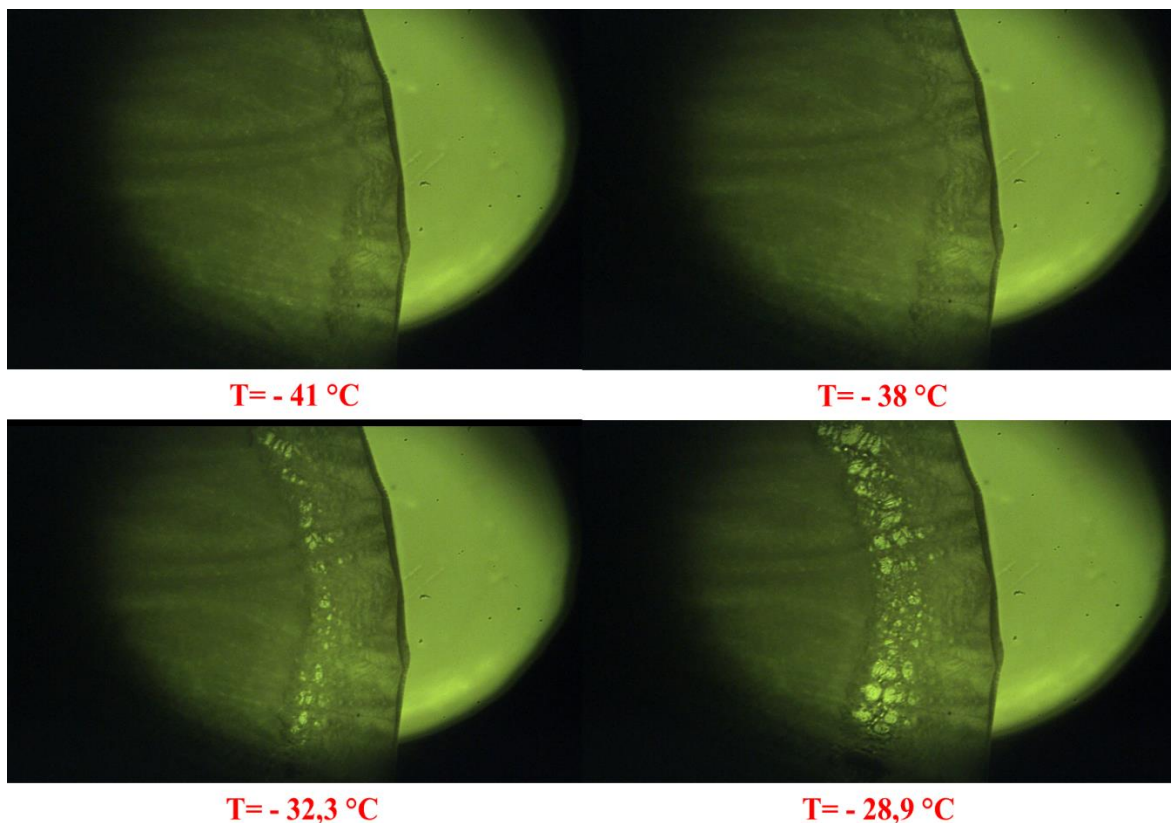
Come si attesta dai dati in Tabella 3.1 la temperatura di transizione delle diverse soluzioni con a differente concentrazione saccarosio rimane pressoché un valore simile e prossimo a -33 °C. Tale risultato è confermato anche da dati di letteratura in cui si attesta un valore di  $T_g$  simile a quello osservato (Horn & Friess, 2018). Anche in (Horn & Friess, 2018), viene osservato, tramite analisi calorimetrica di soluzioni a differente concentrazione di saccarosio, che la percentuale in peso del disaccaride non influenza in modo significativo la temperatura di transizione vetrosa.

### 3.2 Caratterizzazione termica via FDM

Si riportano in questa sezione i risultati relativi all'analisi di caratterizzazione termica eseguite mediante l'utilizzo del Criomicroscopio (FDM, *Freeze-Drying Microscope*). Le soluzioni analizzate sono riportate nel capitolo 2, paragrafo 2.1.2 relativo alla metodica di funzionamento del *Freeze-Drying Microscope*. I campioni sono due, il primo avente una concentrazione del 5% w/w di saccarosio mentre il secondo avente un valore del 10 % w/w del medesimo disaccaride. Entrambi sono in soluzione con buffer citrato 10 mM pH 6.5. Nelle Figure 2.18 e 2.19 vengono riportati i risultati relativi all'analisi termica delle due formulazioni. Quest'analisi permette di identificare la temperatura  $T_c$  in cui avviene il fenomeno di collasso del prodotto, condizione coincidente alla fine del processo di sublimazione e all'inizio della perdita della macrostruttura del campione (Pikal & Shah, 1990).



**Figura 3.4-** raffigurazione dell'andamento del fronte di sublimazione di una soluzione al 5% di saccarosio w/w in buffer citrato 10mM pH 6.5



**Figura 3.5-** Raffigurazione dell'andamento del fronte di sublimazione di una soluzione al 10% w/w di saccarosio in buffer citrato 10mM a pH 6.5

Dalle Figure 3.4 e 3.5 è visibile l'avanzamento del fronte di sublimazione per entrambe le soluzioni. Si può notare che la porzione essiccata (porzione leggermente più scura nell'immagini) inizia ad essere consistente ad una temperatura prossima a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  per entrambi i campioni. La temperatura registrata alla quale si intravede un primo fenomeno di collasso risulta essere prossima a  $T_c = -31,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  per la soluzione al 5% w/w di saccarosio, mentre per la la soluzione al 10 % w/w risulta pari a  $-32,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tali risultati confermano i dati di letteratura (Kristyn, et al., 2013) in cui si osserva un valore di temperatura di collasso del saccarosio medesimo a quello ivi osservato. I risultati dalle analisi del *Freeze-Drying Microscope* ottenuti riflettono i dati calorimetrici ricavati mediante DSC. Infatti anche qui si attesta che il valore di temperatura di collasso per entrambe le soluzioni non risulta essere alquanto differente. Si intravede un inizio di collasso nei campioni al 10% w/w di eccipiente ad una temperatura leggermente maggiore rispetto alla soluzione pari 5% ma si tratta di poche unità.

### 3.3 Risultati relativi alla fase di essiccamento primario

In questa sezione si riportano i risultati riguardanti i cicli di liofilizzazione svolti con differenti metodiche illustrate nel capitolo 2, sezione 2.3. I valori di processo analizzati in questo paragrafo, sia per le prove svolte in modalità batch e sia in configurazione a flaconi in sospenso, sono essenzialmente: durata effettiva del processo di essiccamento primario nei prodotti, differenza tra valori di offset e onset, temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento.

#### 3.3.1 Tempo di essiccamento e uniformità del lotto di produzione

Si ricorda che le prove effettuate a secondo delle soluzioni utilizzate e delle procedure svolte possono essere divise in due gruppi sostanziali. Nel primo gruppo si è utilizza una soluzione 0.01 mg/mL di LDH in buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con il 5% in peso di saccarosio e si sono effettuati, in entrambe le configurazioni, cicli di liofilizzazione aventi protocolli in fase di congelamento differenti (riportati in Tabella 2.4) .Il secondo gruppo riguarda tutte le prove in cui si è variata la concentrazione di eccipiente (5%,10% e 15% w/w) nelle soluzioni ma si è mantenuto il medesimo protocollo di processo.

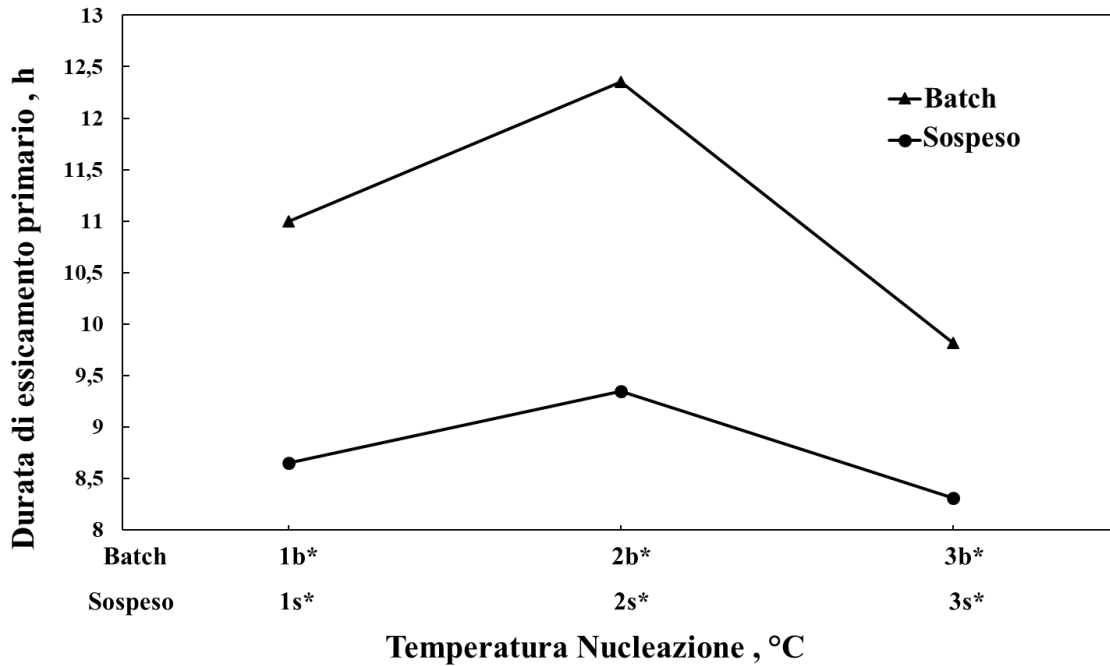
##### *Prove di essiccamento a differente temperatura di nucleazione*

Si illustrano per primi, in Tabella 3.2, i risultati dei tempi di sublimazione e valori di onset e offset, del primo gruppo di prove di liofilizzazione (batch e a flaconi in sospenso) 1b\*, 2b\*,3b\*,1s\*,2s\*,3s\* aventi la medesima soluzione pari a 0.01 µg/ml di LDH in buffer citrato 10 mM a pH 6.5 al 5% di saccarosio. Le prove differiscono per il protocollo di congelamento come mostrato in Tabella 2.4. Per quanto riguarda la procedura utilizzata post fenomeno di nucleazione è stata la medesima per ogni ciclo (i parametri utilizzati in fase di essiccamento, sono visualizzabili in Tabella 2.5, capitolo 2).

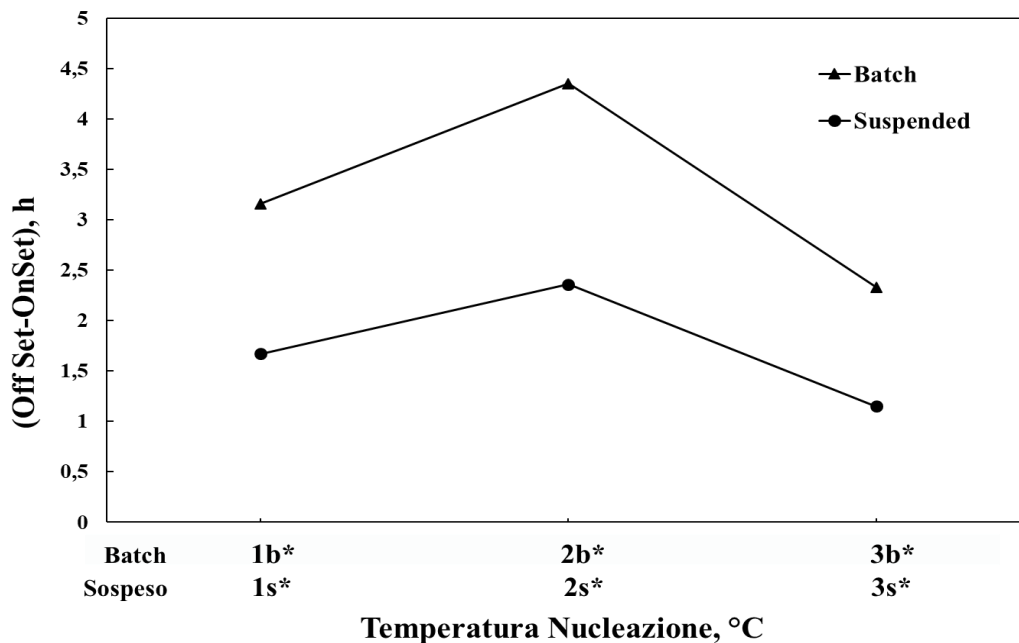
**Tabella 3.2-** *Tempi di essiccamento primario e valori onset, offset per le configurazioni batch e a flaconi sospesi al variare delle condizioni di congelamento ( $T_n$  e  $T_m$ )*

Configurazione	N ~ Prova	$T_n$ °C	$T_m$ °C	(Offset - Onset) [h]	Durata
					essiccamento Primario [h]
BATCH	1b*	-2°C	-5°C	3	11
	2b*	-6°C	-10°C	4	12
	3b*	-2°C	-10°C	2	10
SOSPESO	1s*	-2°C	-12°C	1.5	7
	2s*	-6°C	-18°C	2	9
	3s*	-2°C	-18°C	1	8

Si illustrano in Figura 3.6 i tempi di essiccamento primario e in Figura 3.7 la differenza tra i valori di offset e onset delle prove esposte in Tabella 3.2.



**Figura 3.6-** Tempo di durata essiccamento primario in funzione del protocollo di temperatura utilizzato durante la fase di congelamento delle differenti prove di liofilizzazione svolte. Le prove in modalità batch 1b\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -5^\circ\text{C}$ ); 2b\* ( $T_n = -6^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -10^\circ\text{C}$ ); 3b\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -10^\circ\text{C}$ ). Le prove in modalità sospesa 1s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -12^\circ\text{C}$ ); 2s\* ( $T_n = -6^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -18^\circ\text{C}$ ); 3s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -18^\circ\text{C}$ );



**Figura 3.7-** Differenza valori di Offset e Onset per le diverse prove di liofilizzazione. Tempo di durata essiccamento primario in funzione del protocollo di temperatura utilizzato durante la fase di congelamento delle differenti prove di liofilizzazione svolte. Le prove in modalità batch 1b\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -5^\circ\text{C}$ ); 2b\* ( $T_n = -6^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -10^\circ\text{C}$ ); 3b\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -10^\circ\text{C}$ ). Le prove in modalità sospesa 1s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -12^\circ\text{C}$ ); 2s\* ( $T_n = -6^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -18^\circ\text{C}$ ); 3s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ,  $T_m = -18^\circ\text{C}$ );

In Figura 3.6 viene illustrata la variazione del tempo di essiccamento primario, nelle due configurazioni batch e a flaconi in sospeso, rispetto al protocollo di congelamento utilizzato nelle differenti prove. Si può chiaramente notare come la modalità di processo a flaconi in sospeso, a parità di temperatura di nucleazione dei prodotti, risulta avere dei tempi di sublimazione del prodotto decisamente inferiori rispetto alla configurazione batch. Questo conferma i dati ottenuti in letteratura da (Pisano, et al., 2019), in cui si afferma che nella configurazione in sospeso lo scambio termico è notevolmente ridotto tra ripiano e flaconi. Tale fenomeno è conseguenziale alla generazione possibile, durante la fase di accrescimento cristallino, di nuclei più grandi e uniformi rispetto alla più classica modalità di congelamento in batch. I cristalli in seguito durante la fase di essiccamento primario porteranno a pori di medesima dimensione e larghezza. È noto come il fattore di resistenza, a flusso di sublimazione del vapore acqueo durante la fase di essiccamento primario, espresso come  $R_p$  in Equazione (1.2), sia inversamente proporzionale alla dimensione dei pori formati nel cake dei prodotti (Konstantinidis, et al., 2011). Ne consegue che il flusso di materia sia maggiore in una configurazione in sospeso, durante la fase di essiccamento primario, generando tempi di sublimazione del prodotto inferiori rispetto alla configurazione batch.

Un'altra specifica da poter notare in Figura 3.6 soprattutto per la configurazione batch, è l'andamento del tempo di sublimazione nelle differenti prove con protocolli e temperature di nucleazione in fase di congelamento differenti. La prova che ha riscontrato tempo di sublimazione del prodotto minore risulta essere quella con protocollo di congelamento  $T_n = -2$  °C e  $T_m = -10$  °C. L'ipotesi plausibile può essere che anche qui rispetto le prove a differente fase di congelamento, si siano generati pori aventi una dimensione maggiore, portando a tempi di essiccamento minori. Ad esempio, confrontando le due prove batch aventi la stessa temperatura di nucleazione pari  $T_n = -2$  °C e la prova processata con una  $T_n = -6$  °C, si osserva una variazione, dovuta probabilmente al fatto che le due prove con temperatura di nucleazione inferiore abbiano generato dei pori leggermente maggiori e, conseguentemente, tempi di essiccamento minori. Questo riflette i dati di letteratura (Oddone, et al., 2014) relativi alla possibile connessione tra la temperatura di nucleazione dei prodotti, la dimensione dei pori e i tempi di sublimazione.

La Figura 3.7 confronta la differenza tra tempo di Offset e di Onset, che è riconducibile all'uniformità del lotto di produzione, per le due modalità di carico. Si evince che, in tutte le prove effettuate, la configurazione in sospeso abbia portato a differenze tra valori di offset e onset minori rispetto alla metodica batch. Ne deriva che il caso in sospeso risulta migliorare l'uniformità dei flaconi presenti in camera, riducendo di almeno 2 h (rispetto al batch) questo intervallo di tempo. Si ricorda, inoltre, che in tutte le prove svolte si è utilizzata la tecnica VISF ("Vacuum-Induced Surface Freezing") per il controllo della temperatura di nucleazione. In accordo con quanto qui osservato, (Oddone, et al., 2016) hanno osservato che la tecnica VISF migliora l'uniformità dei lotti di produzione in aggiunta tempi di sublimazione minori rispetto al congelamento convenzionale.

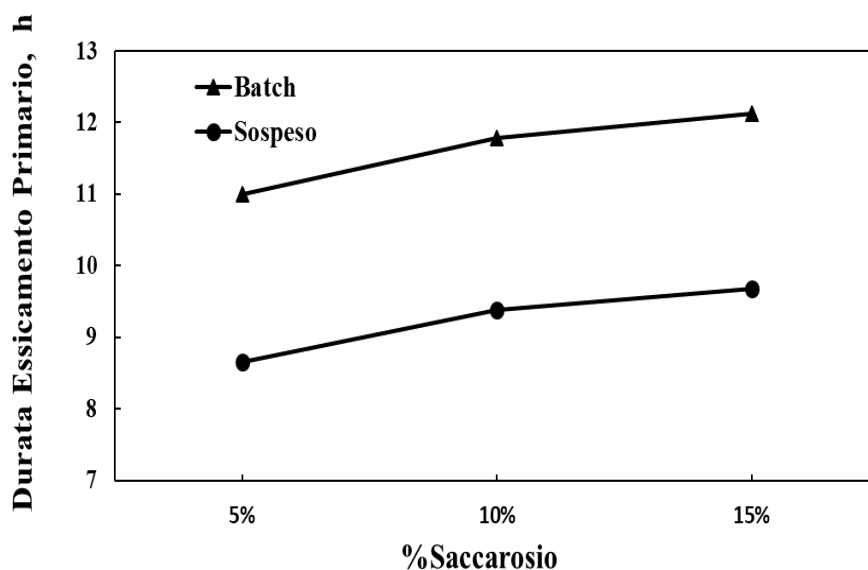
### Prove di essiccamento a differente concentrazione di solido

Si riassumono i risultati in Tabella 3.3 della durata dei tempi di essiccamento primario e i valori di differenza tra Onset e Offset delle prove 1b\*\*, 2b\*\*, 3b\*\*, 1s\*\*, 2s\*\*, 3s\*\* riguardanti la modalità batch (b) e sospeso (s). Le soluzioni utilizzate nei corrispettivi cicli sono diverse e costituite da buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con differente concentrazione in peso di saccarosio, vedi Tabella 2.6. Il protocollo utilizzato, riportato in Tabella 2.7, è stato il medesimo per tutte le prove con la consueta differenza riguardante la temperatura del ripiano nel caso batch e sospeso, nelle fasi di raffreddamento e di mantenimento.

**Tabella 3.3-** Risultati dei tempi di sublimazione e valori onset, offset; prove di liofilizzazione a differente concentrazione di soluto

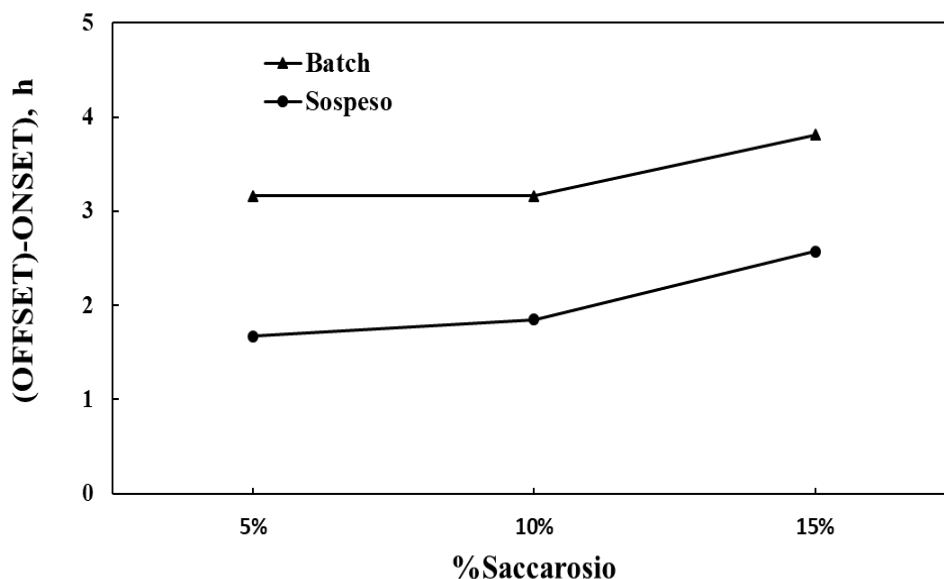
Configurazione	N ~ Prova	(Offset - Onset)	Durata essiccamento Primario
		[h]	[h]
BATCH	1b**	3	11
	2b**	3	12
	3b**	4	12.5
SOSPESO	1s**	1.5	8.5
	2s**	2	9.5
	3s**	3	10

In Figura 3.8 vengono illustrati i risultati riassunti in Tabella 3.3 riguardanti la durata dell'essiccamento primario per le prove svolte mediante le due modalità di processo. In Figura 3.9 vengono illustrati i corrispettivi valori di differenza fra Offset e Onset (riportati in Tabella 3.3 per le differenti prove).



**Figura 3.8-** Tempo di durata dell'essiccamento primario in funzione delle soluzioni con percentuale in peso di saccarosio differente, utilizzate nelle prove di liofilizzazione a configurazione batch e a flaconi in sospeso.





**Figura 3.9-** Differenza valori di OffSet e OnSet per le diverse prove svolte in configurazione batch e a falconi in sospeso con soluzioni aventi percentuali di saccarosio in peso differenti

Dall'analisi dei tempi di essiccamento primario delle prove a diversa concentrazione di saccarosio (Figura 3.8) si conferma ciò che è stato osservato precedentemente nelle prove riguardanti differente temperatura di nucleazione. Come si osserva in Figura 3.8, i cicli di liofilizzazione svolti utilizzando la metodica in sospeso hanno riportato una durata del processo di sublimazione minore in tutte e tre le casistiche, rispetto al caso di processo in modalità batch. Tale aspetto costituisce un'ulteriore conferma che la modalità dei flaconi sospesi accelera la fase di essiccamento di almeno 23%, rispetto alla modalità batch in cui la fase di essiccamento ha una durata media pari a 11 h. Quindi attraverso l'utilizzo di una modalità a flaconi sospesi è possibile diminuire la durata della fase di essiccamento primario dei prodotti e ridurre così il tempo complessivo di processo di un intero ciclo di liofilizzazione (Meyer, et al., 2015).

In Figura 3.8 può essere osservato per entrambe le configurazioni una crescita dei tempi di essiccamento primario all'aumentare della concentrazione di saccarosio costituente le varie soluzioni. L'aumento della concentrazione di soluto in soluzione influenza il grado di porosità del prodotto durante la fase di essiccamento primario. Come si può evincere dai dati di letteratura riportati da (Andrieu, 2007), quest'ultimo parametro è strettamente collegato al fattore di resistenza  $R_p$  legato a sua volta al flusso di materia durante l'essiccamento. Più la porosità nella torta essiccata diminuisce più  $R_p$  aumenta e conseguentemente diminuisce la velocità di sublimazione. Quest'ultima è in relazione diretta con la durata del tempo di essiccamento primario dei prodotti nelle differenti prove. Quindi, con tali considerazioni, in Figura 3.9 si osserva come un aumento della concentrazione di soluto in soluzione generi una diminuzione della porosità dei prodotti essiccati, nelle differenti prove, con una conseguente riduzione della velocità di sublimazione e un aumento della durata del tempo di essiccamento primario.

In Figura 3.9 vengono illustrati le differenze tra i valori di Onset e i valori di Offset nelle diverse prove svolte in entrambe le configurazioni batch e sospeso. Si evince, come la modalità a flaconi sospesi presenta delle differenze tra i tempi di onset e offset minori rispetto alla modalità batch. Lo stesso esito è stato già osservato risultati delle prove aventi differenti protocolli in fase di congelamento, esposti in Tabella 3.3. Si deduce anche in questo caso come la metodica di processo a flaconi sospesi risulta migliorare il fattore di uniformità tra i prodotti.

### 3.3.2 Temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento

Si riportano i risultati inerenti all'analisi della temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento per tutte le prove di liofilizzazione effettuate nel presente progetto di tesi

#### Prove di essiccamento a differente temperatura di nucleazione

In Tabella 3.4 è illustrato il valore di massima temperatura raggiunto dal prodotto in fase di essiccamento per le prove sperimentali 1b\*,2b\*,3b\*,1s\*,2s\*,3s\*. Queste prove coinvolgono la stessa formulazione ed è riportata nella sezione 2.2. Il protocollo in fase di nucleazione e fase di mantenimento, vedi Tabella 2.4, è il medesimo delle prove di congelamento 1b, 2b e 3b con modalità di carico batch e 1s, 2s e 3s per i flaconi sospesi. La procedura e i parametri di processo utilizzati nelle prove di essiccamento sono riportate in Tabella 2.7.

La metodica utilizzata per l'estrapolazione della temperatura massima del prodotto congelato è esposta nella sezione 2.8.

**Tabella 3.4-** Temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento primario

Configurazione	N ~ Prova	$T_n$	$T_m$	$T_1$	$T_{max}$	$T_2$
		°C	°C			
BATCH	1b*	-2°C	-5°C	-31.1	-31.3	-31.5
	2b*	-6°C	10°C	-32.22	-32.05	-31.78
	3b*	-2°C	10°C	-30.53	-31.15	-31.78
SOSPESO	1s*	-2°C	12°C	-31.4	-31.6	-32.54
	2s*	-6°C	18°C	-31.6	-32.07	-32.54
	3s*	-2°C	18°C	-31.6	31.72	-31.85

In Tabella 3.4 sono illustrati i valori di temperatura delle due termocoppie  $T_1$  e  $T_2$ . Quest'ultime sono state utilizzate per misurare la temperatura del prodotto, in ogni ciclo di liofilizzazione, durante la fase di essiccamento primario. La massima temperatura raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento primario è calcolata come la media dei valori registrati da  $T_1$  e  $T_2$ . La metodica utilizzata per l'estrapolazione dei dati esposti di Tabella 3.4 viene illustrata nella sezione 2.8. Paragonando i valori di  $T_{max}$  dei due protocolli di processo batch e continuo, non si evincono differenze sostanziali. Quasi tutte le prove hanno riportato un valore di massima temperatura del prodotto prossimo al valore di temperatura di collasso  $T_c$ . Quest'ultimo rilevato tramite caratterizzazione termica mediante utilizzo del Criomicroscopio (vedere paragrafo 3.2). Si ricorda che la soluzione processata in tutte le prove in Tabella 3.4 è costituita da buffer citrato al 5% di saccarosio la cui temperatura di collasso risulta essere prossima al valore di -31.8 °C. Il protocollo utilizzato, in tali prove di liofilizzazione, in fase di essiccamento primario viene esposto in Tabella 2.7. Quest'ultimo ha permesso lo svolgimento del processo di sublimazione, come viene mostrato dai risultati esposti in Figura 3.6, evitando però il collasso strutturale del prodotto in ogni ciclo di liofilizzazione effettuato, in quanto nessuna delle massime temperature registrate in Tabella 3.4 risulta essere maggiore del valore di temperatura di collasso  $T_c$  pari a -31.8°C. Si ricorda infatti che durante il processo di sublimazione i parametri fondamentali sono la pressione in camera, collegata flusso di materia, e il valore di temperatura del ripiano, collegata al flusso di calore scambiato con i flaconi. Più la temperatura del ripiano durante la

fase di essiccamento primario è alta (massimo -20 °C), più il processo di sublimazione sarà favorito. Esso risulta essere un fenomeno endotermico, il quale sottrae calore al prodotto, abbassandone la temperatura e conseguente la tensione di vapore superficiale del ghiaccio  $P_{ice}$ . Se quest'ultima diminuisce, a parità di basse pressioni in camera, limita anche il flusso di materia generato dal processo di sublimazione dei prodotti. Si deduce come lo scambio termico, tra ripiano e flaconi, durante la fase di essiccamento deve essere tale da garantire la massimizzazione del processo di sublimazione, aumentando la tensione superficiale del prodotto congelato  $P_{ice}$  attraverso un incremento della sua temperatura. Quest'ultima però, non deve esser mai superiore al valore di temperatura di collasso del prodotto (Rambhatla, et al., 2004).

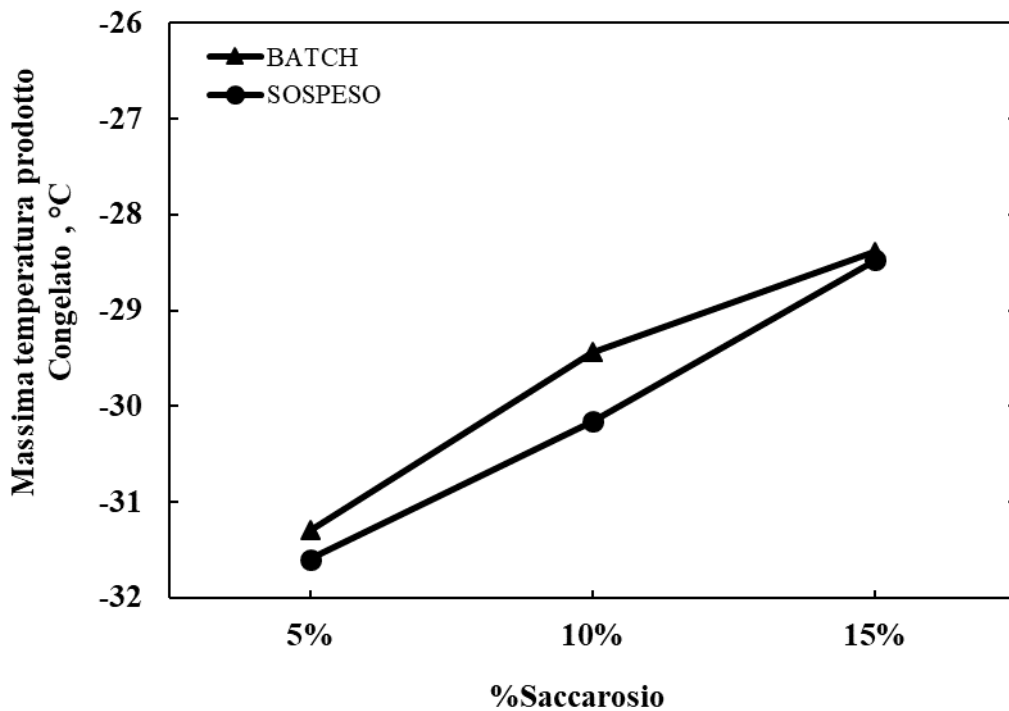
### Prove di essiccamento a differente concentrazione di solido

Si riportano in Tabella 3.5 i risultati riguardanti le prove di liofilizzazione batch (b) e a flaconi in sospenso (s) con soluzioni a differente concentrazione di eccipiente; quali 1b\*\*, 2b\*\*, 3b\*\*, 1s\*\*, 2s\*\*, 3s\*\*. Le formulazioni delle soluzioni utilizzate nelle corrispettive prove sono riassunte in Tabella 2.6. Il protocollo di processo utilizzato (Tabella 2.7) in ogni ciclo è stato il medesimo, con un'unica differenza tra il valore di temperatura di ripiano impiegato per la configurazione batch e a flaconi in sospenso, nelle fasi di raffreddamento e mantenimento.

**Tabella 3.5-** *Temperatura massima del prodotto congelato registrata per le prove di liofilizzazione con soluzioni a differenti concentrazioni di soluto*

Configurazione	N ~ Prova	$T_1$	$T_{max}$	$T_2$
		°C	°C	°C
BATCH	1b**	-31.1	-31.3	-31.5
	2b**	-29.3	-29.44	-29.58
	3b**	-28.17	-28.38	-28.6
SOSPESO	1s**	-31.4	-31.6	-31.8
	2s**	-30.21	-30.16	-30.11
	3s**	-28.1	-28.47	-28.85

I risultati riportati in Tabella 3.5 sono raffigurati in Figura 3.10. Si mette in relazione la variazione della massima temperatura del prodotto congelato in fase di essiccamento primario con la differente percentuale di eccipiente in soluzione utilizzato nelle prove batch e a flaconi in sospenso.



**Figura 3.10-** *Variazione della massima temperatura del Prodotto congelato in fase di essiccamento primario, nelle prove a differente concentrazione di soluto in soluzione*

In Figura 3.10 viene illustrato il valore massimo di temperatura del prodotto congelato ( $T_{max}$ ) registrato, in fase di essiccamento primario, nelle prove a differente concentrazione di soluto in soluzione. Si nota come all'aumentare della concentrazione di eccipiente in soluzione incrementa la temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento in entrambe le modalità di processo batch e a flaconi sospesi. All'aumentare della concentrazione di soluto in soluzione diminuisce la porosità del prodotto essiccato generato durante il processo di sublimazione. Il grado di porosità della torta di prodotto essiccato è relazionata al termine  $R_p$  che rappresenta la resistenza al flusso di vapore durante la fase di essiccamento primario. All'diminuire della porosità dello strato di torta essiccato, aumenta il termine  $R_p$  di resistenza al flusso di vapore e di conseguenza la velocità di sublimazione nello strato di prodotto congelato diminuisce. Nelle prove di liofilizzazione aventi soluzione al 10% e 15% di saccarosio la porosità della torta di prodotto essiccato è minore rispetto alla prova con soluzione al 5% di saccarosio. Questo implica, per quanto detto nel paragrafo precedente, che la velocità di sublimazione del prodotto congelato, a parità di condizioni di processo, risulta essere minore nelle prove al 10% e 15% rispetto alla prova condotta con soluzione al 5% di saccarosio. Si deduce che il calore sottratto al prodotto congelato durante la fase di essiccamento primario, nelle prove con soluzione al 10% e 15% in peso di saccarosio risulta essere minore rispetto alla prova condotta al 5%. Si giustifica perché a parità di condizione di processo (temperatura del ripiano) le prove condotte con soluzioni di saccarosio al 10% e 15% w/w risultano registrare un valore di  $T_{max}$  superiore alla prova condotta con 5% in peso di saccarosio in soluzione. I prodotti con una concentrazione superiore al 5% sia in modalità sospeso che in configurazione batch risultano essere parzialmente collassati. Difatti la loro temperatura massima risulta essere superiore rispetto alla temperatura di collasso del saccarosio pari a circa  $-31.8$  °C (valore visualizzabile, nei risultati riportati nel paragrafo 3.2).

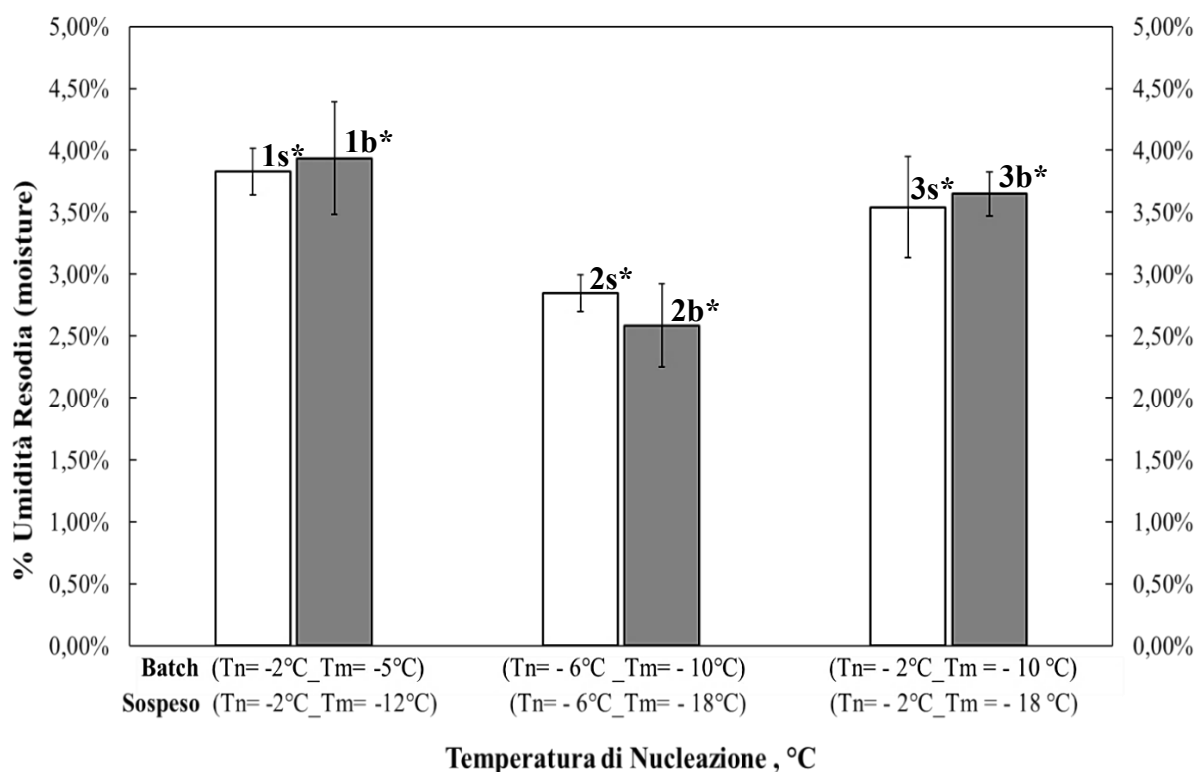
Si confrontano ora i dati (in Figura 3.10) relativi alla temperatura massima in configurazione batch e in modalità sospesa nelle singole prove a differente percentuale di saccarosio in soluzione. Si evince che i valori di  $T_{max}$  per le prove svolte a flaconi sospesi sono leggermente minori rispetto ai valori di massima temperatura dei prodotti appartenenti alle prove effettuate in modalità batch. Questa minima variazione è dovuta al fatto che la struttura del prodotto processato in modalità a falconi in sospeso, a parità di condizioni di processo, presenta dei pori di dimensione maggiore rispetto ai pori generati nel campione in modalità batch (Capozzi, et al., 2019). Il flusso di sublimazione risulterà minore nei prodotti processati in modalità batch rispetto ai campioni processati in configurazione sospesa in quanto quest'ultimi presentano dei pori aventi dimensione maggiore che facilitano dunque il processo di sublimazione e trasferimento di materia. Il calore sottratto in fase di essiccamento primario, attraverso il processo di sublimazione, risulterà minore nei prodotti appartenenti alle prove condotte in modalità batch rispetto ai prodotti processati in modalità sospesa, in quanto il flusso di materia, in quest'ultima configurazione, all'interno dei campioni è facilitato dalla dimensione maggiore dei pori. Da questo si deduce come la massima temperatura del prodotto, a parità di condizioni di processo, nelle prove svolte in modalità sospesa sia minore rispetto al valore di  $T_{max}$  registrato nei cicli condotti in modalità batch.

### 3.5 Analisi del contenuto residuo d'acqua

In questa sezione si riportano i risultati riguardanti le analisi di umidità residua svolte sui campioni liofilizzati mediante il metodo di titolazione Karl Fischer.

#### Prove di essiccamento a differente Temperatura di Nucleazione

Si illustrano in Figura 3.11 i dati di umidità residua ricavati dall'analisi dei flaconi appartenenti ai cicli di liofilizzazione 1b\*,2b\*,3b\*,1s\*,2s\*,3s\*. Tali prove presentano un protocollo di congelamento riportato in Tabella 2.4 Capitolo 2 (risulta essere uguale alle prove 1b,2b,3b,1s,2s,3s). La procedura effettuata in fase di essiccamento primario e secondario è riportata in Tabella 2.5 Capitolo 2 paragrafo 2.3. La formulazione dei prodotti liofilizzati di ogni singola prova a cui si è svolta l'analisi d'umidità residua, risulta essere la medesima, costituita da buffer citrato 10 mM pH 6.5 al 5% w/w di saccarosio. La procedura e metodica con cui sono state svolte le analisi di umidità è riportata nel Capitolo 2 Paragrafo 2.5.



**Figura 3.11-** Analisi d'umidità residua specifica delle prove di liofilizzazione, svolte con una metodica di congelamento differente; Le barre grigie sono relative alle prove batch, quelle bianche alle prove svolte in modalità a flaconi sospesi.

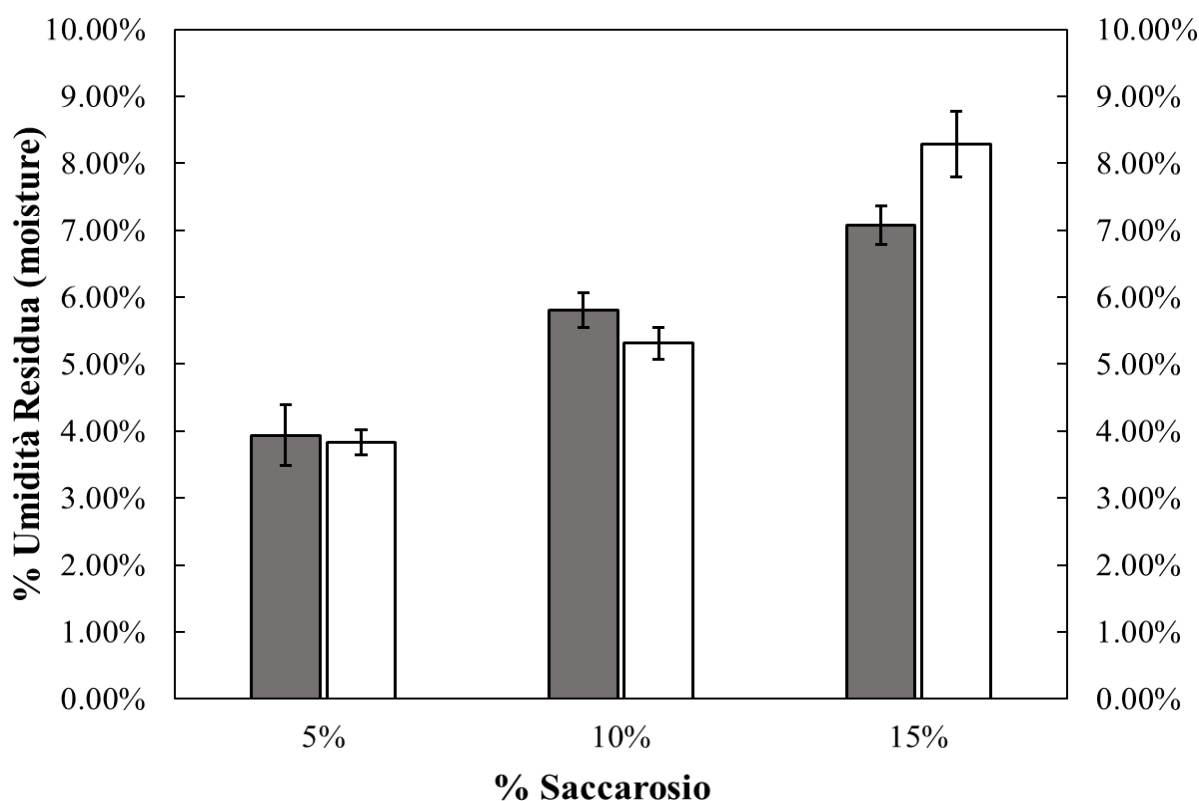
In Figura 3.11 sono riportati i risultati relativi all'analisi d'umidità residua delle prove svolte in configurazione batch e a flaconi in sospeso, in funzione dei protocolli di congelamento utilizzati. Si ricorda che la percentuale di umidità residua è strettamente collegata alla fase di essiccamento secondario. Nella quale, attraverso innalzamento della temperatura dei campioni mediante scambio termico con il ripiano, si promuove il processo di desorbimento delle particelle d'acqua residue all'interno della struttura (a torta) dei prodotti (Nireesha, et al., 2013). È noto come promuovere il processo di nucleazione ad alte temperature con l'utilizzo del VISF (Vacuum Induce Surface) genera la formazione di nuclei cristallini di grande dimensione. I quali durante la fase di essiccamento primario sublimano formando pori di medesima grandezza. Il tutto porta alla formazione di prodotti liofilizzati aventi piccole aree superficiali specifiche con pori di grande dimensione. Tale fenomeno come si evince da dati di letteratura (Oddone, et al., 2017), accelera il processo di sublimazione dei nuclei cristallini ma rallenta il fenomeno di desorbimento dell'acqua nella fase di essiccamento secondario. Difatti dai risultati riportati in Figura 3.12 è possibile notare, per entrambe le configurazioni batch e a flaconi in sospeso, come le prove condotte a temperatura di nucleazione  $T_n = -6$  °C registrano una percentuale di umidità specifica minore rispetto ai cicli effettuati a  $T_n = -2$  °C.

Tali valori confermano ciò che è stato detto precedentemente ovvero alte temperature di nucleazione ( $T_n = -2$  °C) generano prodotti con piccola area superficiale e grandi nuclei (successivamente, pori) cristallini che facilitano il processo/tempo di sublimazione (come si osserva Figura 3.7), ma nello stesso tempo limitano il processo di desorbimento dell'acqua.

In Figura 3.11 non viene rilevata una differenza sostanziale nella percentuale di umidità specifica per quanto riguarda le prove svolte nelle due modalità batch e a flaconi in sospeso. Anche se quest'ultima, dovrebbe promuovere il processo di desorbimento, nella matrice secca di prodotto, già durante la fase di essiccamento primario, in quanto il calore irradiato dalle pareti e dal ripiano coinvolge completamente tutta la superficie di ogni flacone all'interno della camera. Probabilmente tale fenomeno non è avvenuto durante le prove sperimentali effettuate, in quanto la temperatura del ripiano utilizzata durante la fase di essiccamento (pari a -20 °C) non risulta essere eccessivamente alta da favorire il processo di desorbimento. Inoltre i prodotti processati in configurazione sospesa presentano delle strutture aventi dei pori di dimensione maggiore con aree superficiali minori rispetto ai campioni prodotti in modalità batch (Fissore, et al., 2019). Tale fenomeno risulta essere limitante, come detto precedentemente, per il processo di desorbimento durante la fase di essiccamento secondario. Da questo si deduce che la differenza tra le due modalità rispetto ai valori di umidità residua all'interno dei prodotti non risulta essere completamente chiara e dipende dai parametri di processo utilizzati, quali ad esempio la temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario.

### Prove di essiccamento a differente concentrazione di solido

Si illustrano in Figura 3.12 i risultati relativi all'analisi di umidità residua dei prodotti riguardanti i cicli di liofilizzazione 1b\*\*,2b\*\*,3b\*\*,1s\*\*,2s\*\*,3s\*\*. Le prove sperimentali sono state svolte sia in modalità batch (b) che in modalità sospeso (s). Le formulazioni utilizzate per ogni singola prova sono riassunte in Tabella 2.6 e riguardano soluzioni di buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con differenti percentuali in peso di saccarosio (5%,10%,15%). Il protocollo utilizzato per lo svolgimento delle prove sia in modalità batch che in modalità sospesa è riassunto in Tabella 2.7.



**Figura 3.12-** Analisi d'umidità residua specifica delle prove di liofilizzazione aventi soluzioni con differente concentrazione di soluto w/w; Le barre grigie sono relative alle prove batch, Le barre bianche sono relative alle prove svolte a flaconi in sospeso

In Figura 3.12 sono riportati i risultati d'umidità residua in funzione della concentrazione di soluto delle soluzioni utilizzate nelle differenti prove di liofilizzazione effettuate in modalità batch e a flaconi in sospeso. Attraverso tali dati si può notare come la percentuale d'umidità residua all'interno dei prodotti finiti sia proporzionale all'incremento della concentrazione di saccarosio in soluzione. Difatti come illustrato dai dati in Figura 3.12, considerando che il protocollo di congelamento ed essiccamento è stato il medesimo in tutte le prove, i prodotti al 10% e al 15% hanno riportato un valore d'umidità maggiore rispetto ai campioni al 5%. Il processo di desorbimento durante la fase di essiccamento secondario determina quella che è la quantità d'acqua residua all'interno del prodotto finito. Tale fenomeno è in relazione principale con la dimensione della superficie specifica della matrice di prodotto secco, formata post processo di essiccamento primario. Quest'ultima non è influenzata particolarmente dalla



differente formulazione utilizzata nei cicli di liofilizzazione. Quindi direttamente non vi è nessuna relazione tra la quantità di soluto in soluzione e la percentuale d'umidità residua all'interno dei prodotti. Una possibile spiegazione può essere estrapolata dai risultati delle temperature massime dei prodotti congelati relative alle medesime prove (riassunti in Tabella 3.5 e raffigurati in Figura 3.10). Come già detto dai dati si evince come nei prodotti aventi una concentrazione di soluto pari al 10% e 15% in soluzione, siano probabilmente avvenuti fenomeni di microcollasso/collasso strutturale, in quanto le  $T_{max}$  registrate risultano essere superiori alla temperatura di collasso del saccarosio. Come è già affermato in letteratura da (A. Barresi, et al., 2009), generalmente alti valori di umidità residua si registrano nel caso di prodotti in cui sono avvenuti fenomeni di collasso strutturale. Difatti tale fenomeno, causa una perdita di area superficiale specifica della matrice secca, limitando così il processo di desorbimento nei prodotti durante la fase di essiccamento secondario.

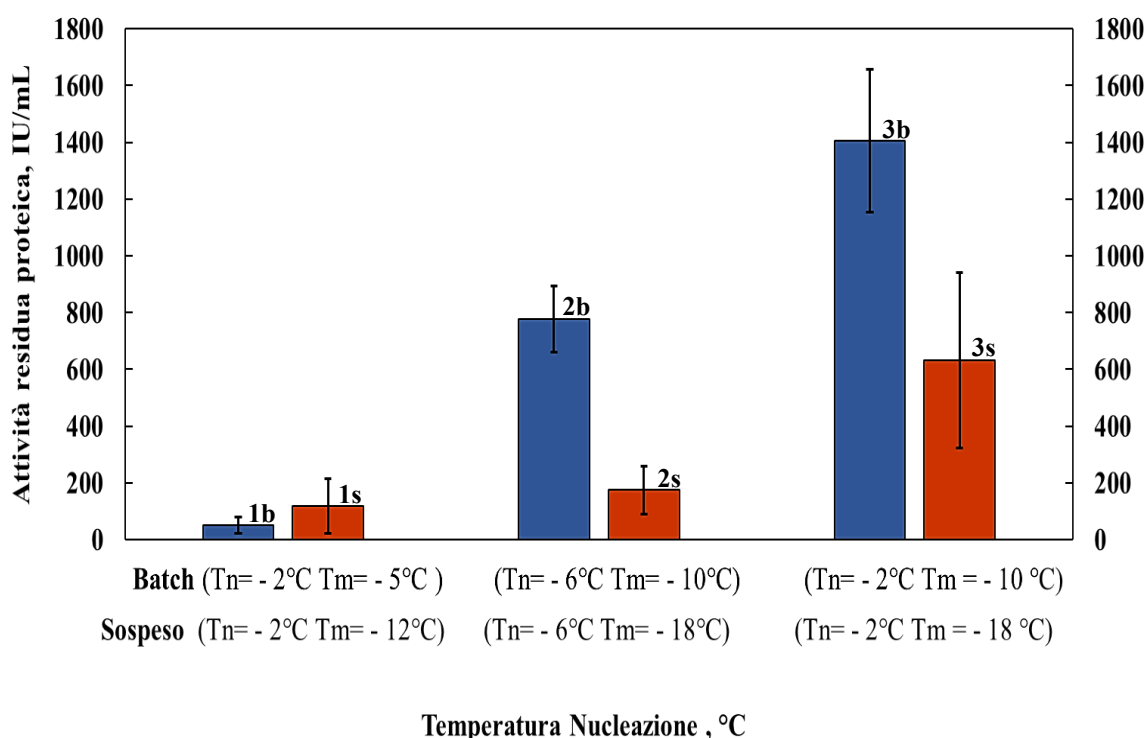
### **3.6 Analisi dell'attività biologica di LDH per le prove di congelamento**

Come illustrato nel Capitolo 2, si sono svolte prove di congelamento sia in modalità batch che in configurazione a flacone sospesi. Durante il processo di congelamento, per entrambe le configurazioni, è stata applicata una tecnica di controllo della nucleazione (VISF, vacuum induced surface freezing) per indurre la formazione di nuclei a due diverse temperature ( $T_n = -2^\circ\text{C}$  oppure  $-6^\circ\text{C}$ ). La soluzione utilizzata è univoca per ogni prova e corrispondente a 0.01 mg/ml di LDH in buffer citrato 10 mM a pH 6.5 con una concentrazione al 5% w/w di saccarosio. L'obiettivo principale consiste nel valutare il residuo di attività enzimatica, nelle due modalità di processo, dopo i diversi protocolli utilizzati nelle prove. Quest' ultime in base alle procedure di congelamento utilizzate possono essere divise in due gruppi sostanziali. Il primo è composto dai cicli che hanno previsto una fase di "mantenimento", post fenomeno di nucleazione, prima di procedere in rampa a  $-45^\circ\text{C}$ . Difatti si è impostato un determinato valore di temperatura di ripiano ( $T_m$ ) così da garantire uno scambio termico con i prodotti per almeno 45 minuti. Tale stadio ha come obiettivo generare un accrescimento cristallino in soluzione controllato, con la formazione di una limitata interfaccia ghiaccio/acqua, avente nuclei di cristallo di grosse dimensioni. Il secondo gruppo è composto dalle prove che non hanno previsto la fase di "mantenimento", ma successivamente al fenomeno di nucleazione si è svolta una rampa di congelamento impostando la temperatura del ripiano a  $-45^\circ\text{C}$ . Le prove in questione sono 1s,2s,3s,4s,5s svolte in modalità a flaconi in sospeso e 1b,2b,3b,4b,5b effettuate in configurazione batch. I protocolli in fase di congelamento utilizzati nei diversi cicli sono specificati nel Capitolo 2 paragrafo 2.2 e i corrispettivi parametri di processo in Tabella 2.4. In Tabella 3.6 si riportano i risultati dell'analisi d'attività enzimatica corrispettivi alle singole prove aventi temperature di nucleazione ( $T_n$ ) e di mantenimento ( $T_m$ ) differenti. La metodica con cui si sono svolte le analisi di attività è illustrata nel Capitolo 2 paragrafo 2.4; i dati riportati in Tabella 3.6 sono espressi secondo unità internazionali [milliunit/mL  $\sim$  IU/mL].

**Tabella 3.6-** Risultati analisi di attività residua enzimatica delle prove a differente protocollo di congelamento

Configurazione	N ~ Prova	$T_n$	$T_m$	Analisi Attività Residua Proteica
		°C	°C	[IU/mL]
<b>BATCH</b>	1b	-2°C	-5°C	50.20
	2b	-6°C	-10°C	777.363
	3b	-2°C	-10°C	1405.92
	4b	-3°C	/	942.52
	5b	-6°C	/	118.45
<b>SOSPESO</b>	1s	-2°C	-12°C	118.16
	2s	-6°C	-18°C	174.32
	3s	-2°C	-18°C	633.36
	4s	-2°C	/	551.20
	5s	-6°C	/	90.40

In Figura 3.13 sono riportati i valori di attività residua proteica per le prove che hanno previsto una fase di mantenimento(1b,2b,3b,1s,2s,3s). I risultati sono espressi in funzione del protocollo di congelamento utilizzato.



**Figura 3.13-** Analisi attività residua enzimatica in funzione del protocollo di congelamento utilizzato per prove svolte in modalità a flaconi in sospeso 1s,2s,3s (Barre rosse) e in configurazione Batch,1b,2b,3b (Barre Blu).

Vi sono quattro fattori principali che contribuiscono alla riduzione della stabilità proteica durante la fase di congelamento, quali: la denaturazione a freddo, stress strutturali indotti dall'interazione con la superficie ghiaccio/acqua (fase di congelamento), rimozione d'acqua (fase di essiccamento primario e secondario), incremento di concentrazione del soluto in soluzione per via del fenomeno di crio-concentrazione (Pikal, et al., 2007).

L'effetto delle condizioni di congelamento ( $T_n$  e  $T_m$ ) influenza la morfologia del prodotto. Un'alta temperatura di nucleazione  $T_n$  induce la generazione di una limitata interfaccia ghiaccio/liquido in soluzione, costituita da nuclei mediamente di grandi dimensioni. Contrariamente una bassa temperatura di nucleazione porta alla formazione di una maggiore superficie cristallina, con nuclei di minore dimensione (Arsiccio, et al., 2018). In letteratura viene riportato da (Fang, et al., 2018), come l'attività residua dell'LDH (lattato deidrogenasi) si preserva maggiormente in soluzioni e prove in cui il fenomeno di nucleazione è stato indotto ad alte temperature (es.  $-2^\circ\text{C}$ ) rispetto ai casi che hanno previsto condizioni di congelamento con  $T_n$  inferiori (es.  $-6^\circ\text{C}$ ;  $-8^\circ\text{C}$ ). Il tutto viene spiegato ipotizzando che, durante la fase di congelamento, l'interazione da parte del LDH in soluzione con una superficie cristallina di minore estensione (alte  $T_n$ ), ne preservi maggiormente l'attività residua enzimatica, limitando il processo di adsorbimento e denaturazione. Quindi quest'ultima secondo (Fang, et al., 2018), cresce proporzionalmente alla temperatura alla quale si è indotto il fenomeno di nucleazione in soluzione. Dai risultati ottenuti nel progetto di tesi in Figura 3.13, non si evince in prima analisi questa linearità. Infatti dai dati si osserva che i campioni riguardanti la prova 1b condotta in modalità batch a  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -5^\circ\text{C}$ , risultano avere una attività residua proteica più bassa rispetto ai prodotti appartenenti al ciclo 2b batch svolto con condizioni di  $T_n = -6^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10^\circ\text{C}$ . Tale fenomeno come detto è in disaccordo con i dati di letteratura riportati da (Fang, et al., 2018) ma risulta di possibile spiegazione analizzando la temperatura nella fase di mantenimento utilizzata. È probabile che nella prova 1b batch condotta in condizioni di  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -5^\circ\text{C}$ , la temperatura di mantenimento non fosse abbastanza bassa da consentire il completo congelamento della soluzione, promuovendo così una nucleazione spontanea sulla superficie inferiore del prodotto quando la temperatura del ripiano viene ridotta a  $-45^\circ\text{C}$ . In tal caso durante la fase di "mantenimento" non vi è accrescimento cristallino per sottrazione di calore da parte del ripiano al prodotto, ma bensì avviene il fenomeno di "melting back" ovvero lo scioglimento dei cristalli di ghiaccio in soluzione (Oddone, et al., 2014).

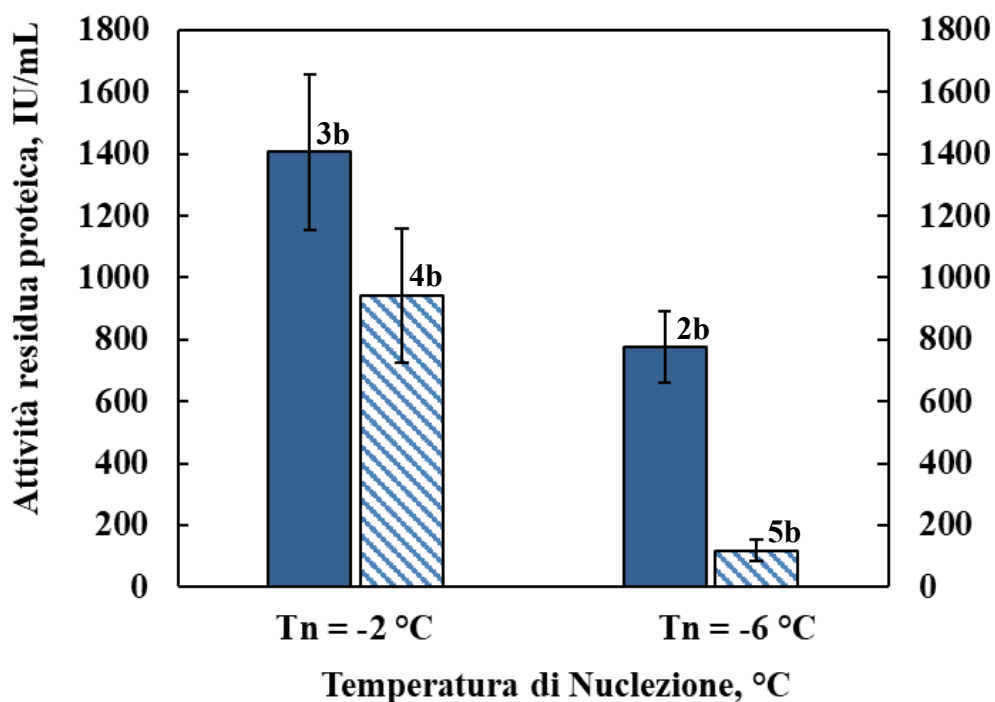
Il principio proteico in questa condizione è notevolmente denaturato entrando in contatto con processi di generazione e degenerazione di nuclei cristallini che portano infine ad avere un'interfaccia ghiaccio/acqua diversa rispetto a ciò che ci si aspetta di ottenere con  $T_n = -2^\circ\text{C}$ .

L'ipotesi fatta è confermata dai risultati ottenuti dall'analisi di attività residua enzimatica, esposti in Figura 3.13, dei campioni appartenenti alla prova 3b batch con condizioni di congelamento pari a  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10^\circ\text{C}$ . Qui una minore temperatura di mantenimento ha evitato il fenomeno di "melting back" promuovendo un l'accrescimento cristallino durante la fase di mantenimento con una possibile formazione di un interfaccia ghiaccio/acqua che ha permesso di preservare maggiormente, rispetto gli altri casi, l'attività enzimatica. Per quanto riguarda le prove svolte in configurazione in sospeso le considerazioni sono le medesime.

I campioni che hanno registrato un'attività residua proteica maggiore risultano essere quelli appartenenti alla prova 3s di condizioni  $T_n = -2^\circ\text{C}$   $T_m = -18^\circ\text{C}$ . Invece i campioni del ciclo 1s svolto in condizioni di  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -12^\circ\text{C}$ , risultano avere un residuo d'attività enzimatico decisamente basso. Anche qui si nota, come nella prova batch 1b a  $T_n = -2^\circ\text{C}$   $T_m = -5^\circ\text{C}$ , un possibile fenomeno di melting back, con mancato accrescimento cristallino durante lo step di "mantenimento". Un altro fattore visualizzabile in Figura 3.13 risulta essere la marcata differenza di attività residua enzimatica tra i campioni appartenenti alla prova batch 3b con  $T_n = -2^\circ\text{C}$   $T_m = -10^\circ\text{C}$  e la prova a flaconi in sospeso 3s con  $T_n = -2^\circ\text{C}$   $T_m = -18^\circ\text{C}$ . Tale differenza può essere legata al diverso calore di scambio termico tra flaconi e ripiano nelle due

configurazioni durante la fase di congelamento. In modalità a flaconi in sospeso lo scambio termico è decisamente ridotto per via del mancato contatto diretto con il ripiano. Così l'accrescimento cristallino in soluzione in una configurazione a flaconi in sospeso risulta essere un fenomeno decisamente più lento rispetto ad una modalità batch. Per questo si suppone che il completo congelamento del prodotto, nella prova in sospeso, non si raggiunga durante la fase di mantenimento ma bensì soltanto dopo aver avviato la rampa di raffreddamento impostando la temperatura del ripiano a  $-45^{\circ}\text{C}$ . Dunque Il principio enzimatico nel caso della prova a flaconi in sospeso 3s ( $T_n = -2^{\circ}\text{C}$ ,  $T_m = -18^{\circ}\text{C}$ ) rispetto alla prova batch 3b ( $T_n = -2^{\circ}\text{C}$   $T_m = -10^{\circ}\text{C}$ ), rimane più tempo ad interagire con un'interfaccia ghiaccio/acqua, prima che si raggiunga il completo congelamento della soluzione. Tale considerazione è illustrata nel paragrafo 3.7 riguardante i risultati relativi alle analisi termiche delle prove in questione, dove si estrapolerà una relazione lineare che lega i tempi di congelamento della soluzione nei diversi cicli con l'attività residua enzimatica.

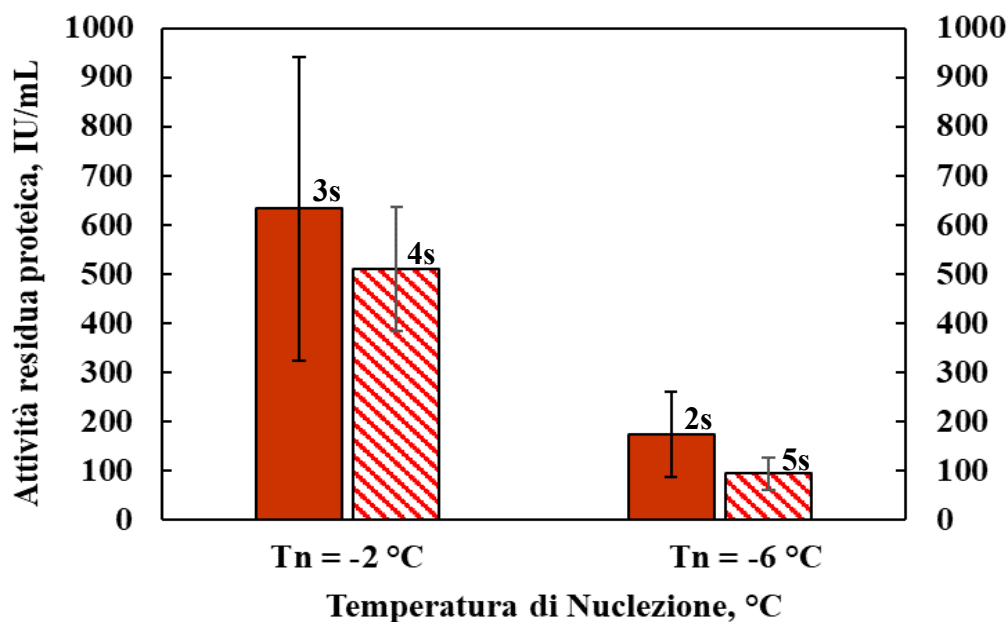
In Figura 3.14 si illustrano i risultati relativi all'analisi d'attività enzimatica delle prove batch 4b e 5b in cui non si è svolto lo step di mantenimento ma bensì dopo il fenomeno di nucleazione si è effettuata una rampa di raffreddamento portando direttamente la temperatura del ripiano a  $-45^{\circ}\text{C}$ . I dati sono confrontati a parità di temperatura di nucleazione con le prove batch 2b e 3b in cui invece si è svolto lo step di mantenimento impostando le temperatura del ripiano dal un valore specifico  $T_m$  (riportato in Tabella 3.6). Il fine consiste nel verificare se realmente lo step di mantenimento della soluzione in una condizione di scambio termico con la temperatura di ripiano costante per circa 45 minuti, abbia contribuito nel preservare maggiormente l'attività residua proteica.



**Figura 3.14-** Risultati attività residua proteica illustrati secondo protocollo di congelamento ( $T_n$ ); Prove batch a barre piene blu (2b e 3b in Tabella 3.5) in cui è avvenuto lo step di mantenimento e prove a barre tratteggiate (4b e 5b in Tabella 3.5) in cui non è avvenuto lo step di mantenimento

In Figura 3.14 si evince che per entrambi i protocolli di congelamento utilizzati  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_n = -6^\circ\text{C}$  le prove batch 2b, 3b che hanno previsto uno step di mantenimento (ad una determinata  $T_m$  visualizzabile in Tabella 3.5), hanno riportato valori di attività residua enzimatica maggiori rispetto alle prove 4b e 5b in cui tale step non si è svolto. Questi risultati dimostrano come lo step di mantenimento post nucleazione per la configurazione batch, preservi maggiormente l'attività proteica in soluzione. Una possibile spiegazione risiede nello scambio termico tra i prodotti e il ripiano durante la fase di mantenimento. In quest'ultimo essendo la temperatura del ripiano costante per 45 minuti, favorisce un accrescimento cristallino in soluzione tale da formare una limitata interfaccia ghiaccio/acqua con nuclei di grandi dimensioni. Quindi si ipotizza che nelle prove batch 2b,3b il principio proteico risulti maggiormente preservato in quanto si interfaccia con una superficie di ghiaccio limitata per un tempo di congelamento ugualmente adeguato (fattore tempo di contatto proteina-interfaccia ghiaccio/acqua chiarito nel paragrafo 3.7). Nelle prove 4b,5b in cui non è avvenuto lo step di mantenimento la temperatura del ripiano, post nucleazione, è scesa in rampa di raffreddamento fino al valore di  $-45^\circ\text{C}$ . Così facendo lo scambio termico prodotto - ripiano risulta essere maggiore, portando in questo caso ad un processo di accrescimento cristallino accelerato, con formazione di nuclei di piccole dimensioni e un'estesa interfaccia ghiaccio/acqua. Ricordando la relazione tra il principio proteico e l'interfaccia ghiaccio/acqua in soluzione definita precedentemente, si chiarisce perché le prove batch in cui è avvenuta una fase di mantenimento hanno preservato maggiormente l'attività enzimatica. Inoltre, per attestare la validità dei risultati si è effettuata un'analisi statistica dei dati, calcolando il p-value, delle prove batch 3b (con step di mantenimento) e 4b (priva dello step di mantenimento) svolte entrambe a temperatura di nucleazione  $T_n = -2^\circ\text{C}$ . Si è riportato un valore di significatività pari a 0.005, dimostrando che i risultati d'attività residua enzimatica delle due prove (3b e 4b in Figura 3.14) sono significativamente diversi (in quanto il p-value è al di sotto del valore limite ovvero 0.05, ipotesi di "null").

In Figura 3.15 sono riportati i risultati d'attività residua proteica corrispettivi alle prove 4s e 5s (Tabella 3.5) svolte in configurazione a flaconi sospesi. In tali prove non si è svolto lo step di mantenimento ma, post nucleazione, si effettuato una rampa di raffreddamento portando la temperatura del ripiano direttamente a  $-45^\circ\text{C}$ . In Figura 3.15 vengono anche riportati risultati dell'analisi residua enzimatica delle prove 2s e 3s in cui come si evince in Tabella 3.5 si è effettuato lo step di mantenimento. Tutto questo per verificare se anche nelle prove a flaconi sospesi a parità di temperatura di nucleazione, lo step di mantenimento ha costituito un fattore di miglioramento dell'attività residua enzimatica durante la fase di congelamento. I protocolli di congelamento utilizzati nelle prove illustrate in Figura 3.15 sono riportati in Tabella 2.4, capitolo 2, paragrafo 2.2.



**Figura 3.15-** Risultati attività residua proteica illustrati secondo protocollo di congelamento ( $T_n$ ); Prove a flaconi sospesi piene rosse (2s e 3s in Tabella 3.5) in cui è avvenuto lo step di mantenimento e prove a flaconi sospesi barre tratteggiate (4s e 5s in Tabella 3.5) in cui non è avvenuto lo step di mantenimento

In Figura 3.15 si nota come, a parità di temperatura di nucleazione, i risultati d'analisi d'attività enzimatica riguardanti le prove a flaconi sospesi in cui si è effettuato lo step di mantenimento (2s e 3s) non siano così differenti rispetto ai risultati d'attività riguardanti i cicli privi di tale step (4s e 5s). Anzi attraverso l'analisi statistica calcolando il p-value dei dati riguardanti le prove 2s e 4s (entrambe con  $T_n = -2^\circ\text{C}$ ) si è verificato un valore di significatività pari a 0.75. Tale valore, essendo superiore al valore limite di 0.05 conferma l'ipotesi di "null", ovvero che i risultati d'attività residua enzimatica corrispettivi alle prove prese in esame sono pressoché simili. Quindi in caso di una configurazione a falconi sospesi risulta non esserci nessuna relazione tra il residuo d'attività enzimatica e lo step di mantenimento durante la fase di congelamento della soluzione. Questo valorizza l'ipotesi fatta nei paragrafi precedenti, in cui si sostiene che lo scambio termico tra prodotto e ripiano in una configurazione sospesa è inferiore rispetto al caso batch. Dunque l'accrescimento cristallino nel caso di flaconi processati in sospeso risulta essere molto lento in fase di mantenimento e il processo di congelamento della soluzione termina soltanto una volta in rampa di raffreddamento con l'abbassamento della temperatura del ripiano fino a  $-45^\circ\text{C}$ . Detto questo si ipotizza che in configurazione in sospeso, eseguire uno step di mantenimento rispetto ad una rampa diretta di raffreddamento post nucleazione, non crea nessuna differenza morfologica sostanziale riguardante l'interfaccia ghiaccio/acqua durante la fase di congelamento.

Dunque la stabilità del principio proteico, nelle prove con modalità a flaconi sospesi a parità di  $T_n$ , non è influenzata particolarmente dai due protocolli differenti utilizzati in fase di congelamento.

### 3.7 Analisi dello scambio termico durante la fase di congelamento

Si è analizzato lo scambio di calore tra ripiano e flaconi durante la fase di congelamento. L'obiettivo consiste nell'individuare le differenze nella fase di raffreddamento e congelamento del prodotto tra le prove a flaconi in sospeso e quelle svolte a modalità batch. In seguito correlare i risultati relativi all'analisi di scambio termico di tutte le prove di congelamento svolte con i dati corrispettivi l'attività biologica di LDH.

Le analisi termiche sono state svolte sulle prove 1b,2b,3b, riguardante la modalità batch e 1s,2s,3s relative alla configurazione in sospeso. I protocolli di congelamento utilizzati per ogni singolo ciclo sono illustrati nel paragrafo 2.2 e i corrispettivi parametri di processo impiegati ( $T_n$  e  $T_m$ ) sono riassunti, per entrambe le configurazioni, in Tabella 2.4. La metodica di analisi termica utilizzata è stata la medesima per ogni ciclo di congelamento e viene riportata nello specifico nel paragrafo 2.6. Insieme ad essa vengono illustrate le considerazioni fatte e calcoli effettuati, per ogni prova di congelamento, relativi ai diversi valori quali: coefficienti di scambio termico globali ( $U_{sospeso}$ ,  $U_{batch}$ ), potenze termiche di accrescimento, calori di accrescimento e tempi di congelamento della soluzione processata.

#### Fase di raffreddamento

Si riportano i risultati relativi all'analisi termica della fase di raffreddamento, in cui si è abbassata la temperatura della soluzione fino al raggiungimento del valore al quale si desidera far avvenire il processo di nucleazione (differente per le varie prove come mostrato in Tabella 2.4, Capitolo 2). Attraverso il bilancio di calore illustrato in equazione (2.9), e analizzato nel paragrafo 2.6 Capitolo 2, si sono ricavati i coefficienti di scambio termico globale ( $U$ ) per tutte le prove di congelamento riguardanti le due diverse configurazioni. In seguito si è effettuata la media di tali valori, ottenendo dei coefficienti globali per le due modalità di processo batch ( $U_{batch}$ ) e a flaconi sospesi ( $U_{sospeso}$ ).

$$U_{batch} = 0.0077 \pm 0.000829 \text{ W/K}$$

$$U_{sospeso} = 0.0026 \pm 0.00038 \text{ W/K}$$

Dai risultati relativi ai coefficienti di scambio globale medio, si può dedurre come la potenza termica scambiata istantaneamente tra prodotto e ripiano in una configurazione batch possa essere maggiore rispetto alla modalità a flaconi sospesi durante il processo di congelamento. Facendo il rapporto tra i due valori ( $\frac{U_{batch}}{U_{sospeso}} \sim 3$ ), si evince come il coefficiente globale di scambio medio per la configurazione batch sia circa 3 volte superiore rispetto al coefficiente  $U_{sospeso}$ . Tale risultato è giustificato in quanto nella modalità batch i flaconi sono in diretto contatto con il ripiano e il termine conduttivo (composto anche dal gas presente nell'intercapedine flacone-ripiano) risulta avere un'importanza rilevante per quanto riguarda il valore di potenza termica istantanea scambiata durante il processo di congelamento. Invece, nella modalità a flaconi in sospeso il termine conduttivo non è presente in quanto i prodotti appunto sono sospesi e non a contatto diretto con il ripiano. Dunque lo scambio termico in modalità a flaconi in sospeso risulta essere inferiore rispetto alla configurazione batch, in quanto non avviene tramite conduzione diretta tra prodotto-ripiano ma bensì attraverso la convezione dell'aria presente in camera durante tutto il processo di congelamento. È possibile ugualmente riprodurre il medesimo profilo di temperatura del prodotto durante la fase di raffreddamento in

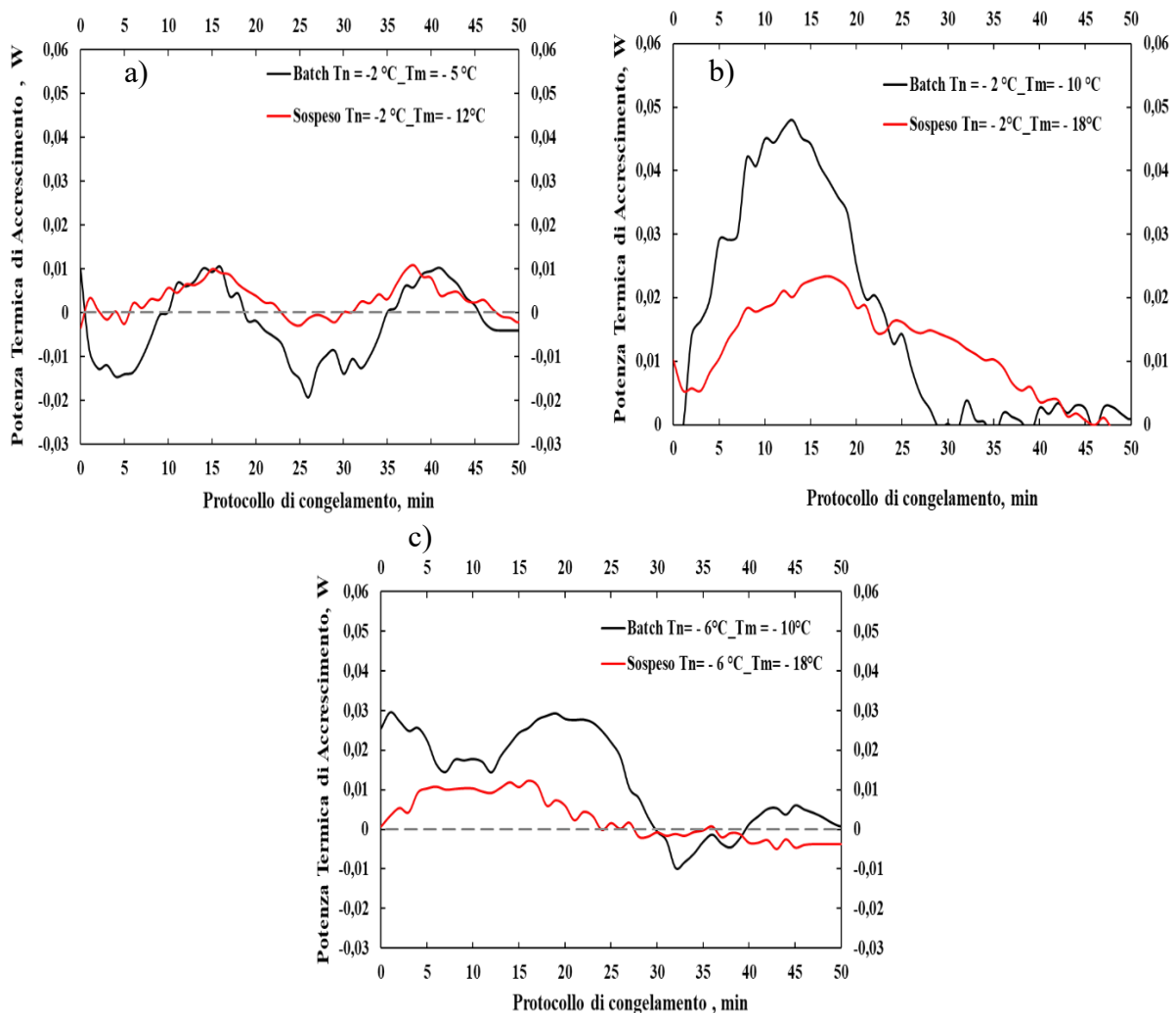
entrambe le due configurazioni, aumentando la forza spingente, quindi il gradiente di temperatura ripiano-prodotto, nel caso della modalità di processo a flaconi sospesi.

### Fase di congelamento

Si riportano i risultati relativi alle analisi termiche effettuate nella fase di congelamento che, come istante iniziale di tempo, prende in considerazione il momento successivo al fenomeno di nucleazione. Difatti l'obiettivo consiste nel correlare i dati relativi allo scambio termico in tale fase con il processo di accrescimento cristallino in soluzione e con i risultati riguardanti le analisi d'attività biologica di LDH nelle differenti prove di congelamento svolte.

Quindi in primis si riportano in Figura 3.16 i risultati relativi delle potenze di calore ( $\dot{Q}_{acc}$ ) effettive generate dal fenomeno di accrescimento cristallino di tutte le prove di congelamento effettuate nelle due modalità di configurazione batch e flaconi in sospeso.

La metodica di calcolo e le considerazioni effettuate per ricavare i valori relativi a tale potenza termica sono riportati nel paragrafo 2.6.



**Figura 3.16-** (a) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 1b e 1s; (b) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 3b e 3s; (c) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 2b e 2s; Le curve di potenza in rosso sono relative alla configurazione a flaconi in sospeso, mentre in nero alla configurazione batch.

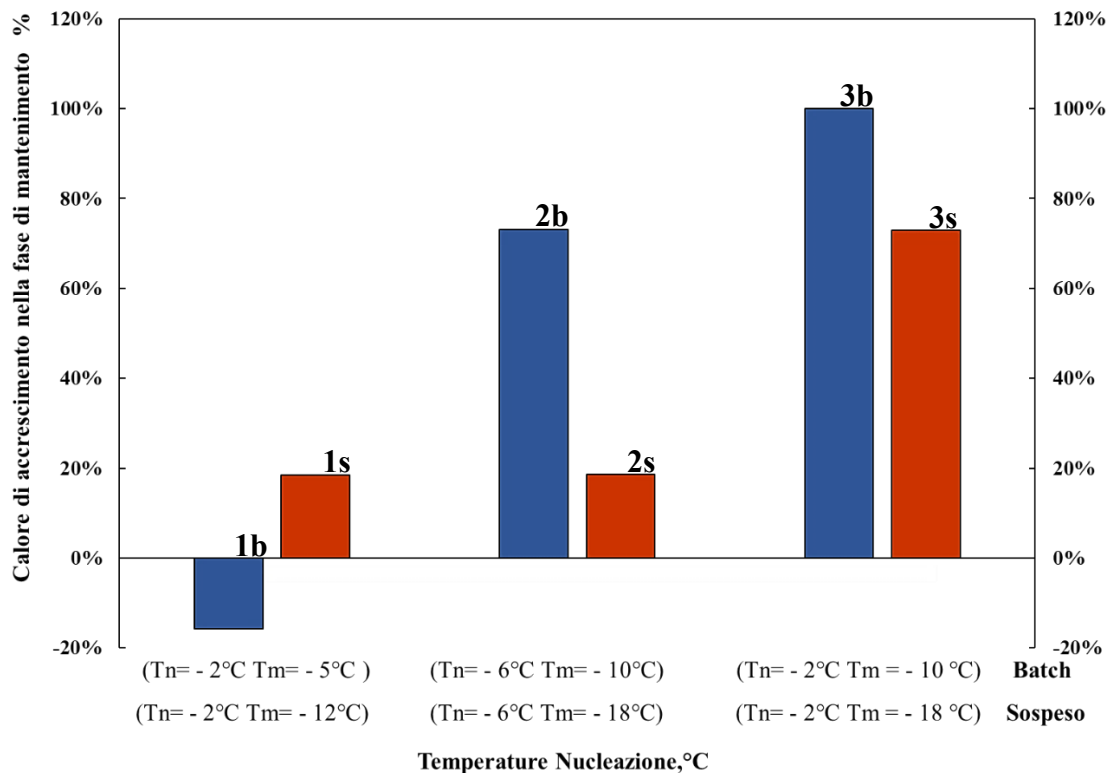


In Figura 3.16 (a) vengono illustrati i risultati relativi alle potenze termiche di accrescimento della prova batch 1b, avente condizioni di congelamento pari a  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -5^\circ\text{C}$ , e della prova di congelamento a flaconi sospesi con i parametri di congelamento pari a  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -12^\circ\text{C}$ . Come si può evincere (in Figura 3.16 (a)) entrambe le curve relative alle due potenze termiche, batch in nero e a flaconi in sospeso in rosso, oscillano intorno al valore pari a zero per tutta la durata della fase di mantenimento (pari a 45/50 min) post fenomeno di nucleazione. Ciò significa che la potenza termica, per entrambe le prove, relativa all'accrescimento cristallino in soluzione, risulta essere praticamente nulla. In questo caso in entrambe le prove di congelamento, a differente modalità, è possibile dire che sia avvenuto il fenomeno di "melting-back" nella soluzione processata. Ovvero il mancato accrescimento e successivo scioglimento dei nuclei cristallini in soluzione durante la fase di mantenimento per entrambe le due prove. Tale fenomeno viene generato in quanto il valore di temperatura di mantenimento, utilizzata nelle due prove 1b e 1s, del ripiano  $T_m$  risulta essere troppo alto. Quindi non viene garantito un adeguato scambio di calore con prodotti, tale per cui possa avvenire il fenomeno di accrescimento cristallino in soluzione con successiva formazione dell'interfaccia ghiacci/acqua. Per le prove di congelamento 1b e 1s, i cui protocolli sono illustrati in Tabella 2.4 Capitolo 2, l'ipotesi relativa ad un possibile fenomeno di melting back era già stata utilizzata nella discussione riguardante le analisi d'attività biologica di LDH (paragrafo 3.6 Figura 3.13). Tale considerazione viene quindi ancor di più convalidata dai risultati estrapolati mediante l'analisi termica svolta sulle due prove.

In Figura 3.16 (b) vengono illustrati i risultati dell'andamento delle potenze termiche di accrescimento corrispettive alle prove di congelamento 3b e 3s, aventi le stesse condizioni di temperatura di nucleazione ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ) delle prove in Figura 3.16 (a) ma differenti temperature di mantenimento (caso batch  $T_m = -10^\circ\text{C}$ , caso sospeso  $T_m = -18^\circ\text{C}$ ). Per entrambe le prove si evince in Figura 3.16 (b) come la potenza termica di accrescimento non sia nulla durante la fase di mantenimento. A differenza del caso esposto nel paragrafo precedente il fenomeno di "melting back" nelle prove 3b e 3s non sembra essere presente. In tali prove, temperature di ripiano più basse durante la fase di mantenimento, hanno permesso un adeguato scambio termico flacone-ripiano, in grado di garantire il fenomeno di accrescimento cristallino in soluzione e la formazione di una determinata interfaccia ghiaccio/acqua. Si suppone come il processo di accrescimento cristallino, specialmente nella prova batch 3b e anche in parte nella prova a flaconi sospesi 3s, avvenga durante la fase di mantenimento per poi completarsi con il congelamento della soluzione in rampa di raffreddamento, abbassando la temperatura del ripiano a  $-45^\circ\text{C}$ .

Inoltre in Figura 3.16 (b) si evince come la potenza termica di accrescimento riguardante la prova 3b sia sempre superiore, durante la fase di mantenimento, rispetto alla potenza riferita alla prova in sospeso 3s. È possibile notare il medesimo risultato anche per le potenze termiche di accrescimento, esposte in Figura 3.16 (c), riguardanti la prova a flaconi in sospeso 2s e la prova in modalità batch 2b.

Tale considerazione risulta essere più evidente in Figura 3.17, in cui si sono calcolati i calori di accrescimento, durante la fase di mantenimento, per tutte le prove di congelamento effettuate. I dati esposti in Figura 3.17 risultano essere normalizzati per il calore maggiore di scambio termico registrato, che è corrispettivo alla prova batch 3b, avente condizioni congelamento  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10^\circ\text{C}$ .

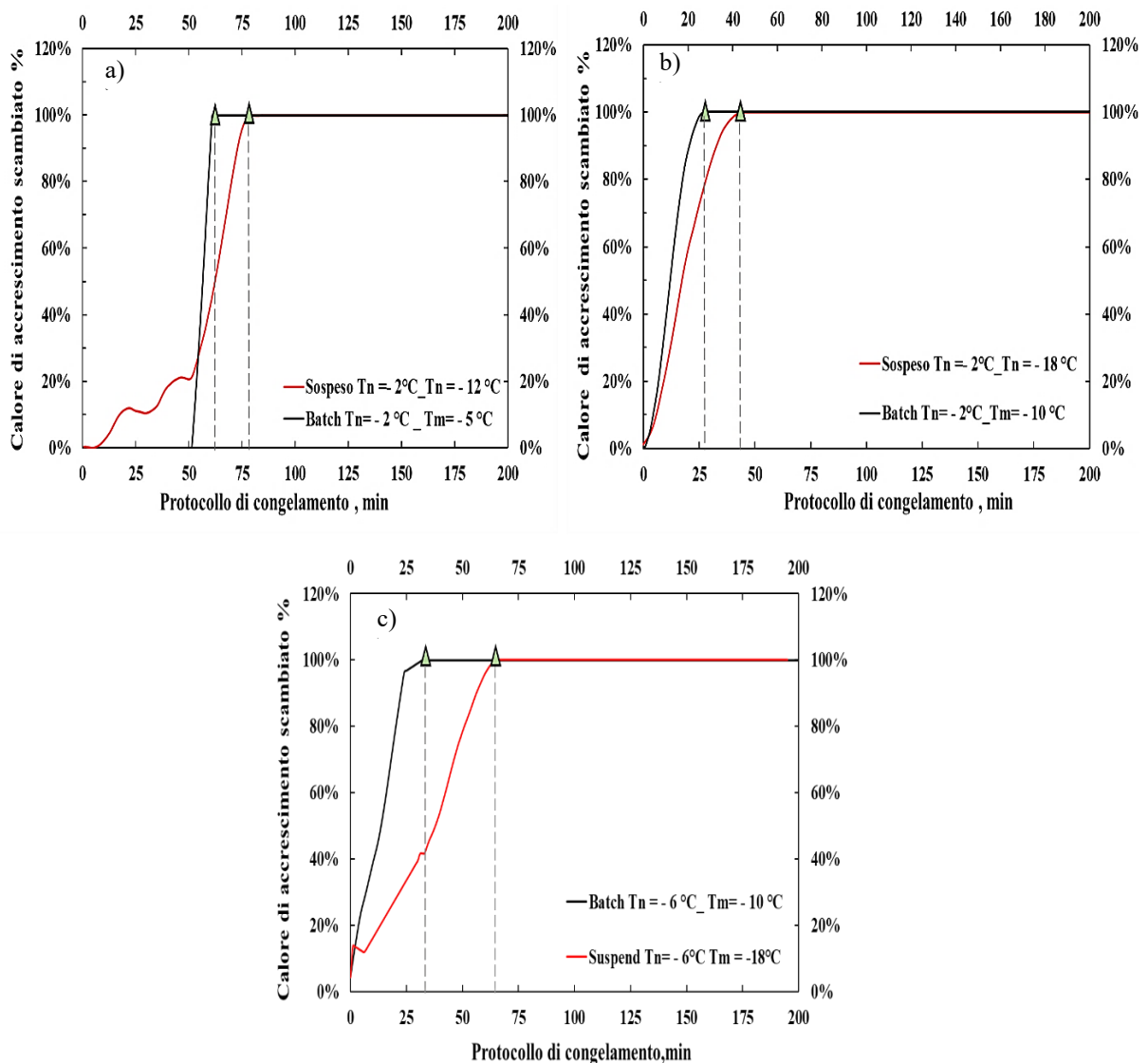


**Figura 3.17-** Calore di accrescimento calcolato nella fase di mantenimento per le prove di congelamento 1b, 1s, 2b, 2s, 3b, 3s, condotte a differente protocollo di congelamento riportato in specifico in Tabella 2.4 capitolo 2; Le barre rosse sono indicative delle prove svolte in modalità sospesa, Le barre blu sono indicative delle prove svolte in modalità batch.

In Figura 3.17 è chiaramente visibile, a parità di protocollo utilizzato (corrispondente a  $T_n$  e  $T_m$ ), come i calori di accrescimento, calcolati nella fase di mantenimento, riguardanti le prove in modalità batch siano mediamente superiori rispetto ai valori corrispondenti registrati per le prove condotte in configurazione sospesa. L'unica eccezione riguarda i cicli di congelamento 1b e 1s, in cui il calore di accrescimento in percentuale è molto inferiore rispetto ai valori calcolati nelle altre prove e giustifica ciò che detto precedentemente riguardo il possibile fenomeno di melting back. In Figura 3.17 si osserva come lo scambio termico flacone-ripiano, durante la fase di mantenimento, per due configurazioni (prove batch e a flaconi sospesi) sia sostanzialmente differente. Si ipotizza dunque che tale differenza si ripercuota sul fenomeno di accrescimento nelle soluzioni delle differenti prove processate nelle modalità. Il fenomeno di accrescimento cristallino, nelle prove batch (2b e 3b), ha inizio sicuramente nella fase di mantenimento per poi completarsi con il congelamento delle soluzioni non appena la temperatura del ripiano viene ridotta e portata a  $-45^\circ\text{C}$ . Mentre per le prove svolte in configurazione in sospeso, specialmente il ciclo 2s rispetto al ciclo 3s, il fenomeno di accrescimento in soluzione è ridotto in fase di mantenimento, per il minor scambio termico, e si sviluppa completandosi soltanto nella fase successiva riguardante la rampa di raffreddamento. È possibile che il tutto porti ad una differente formazione d'interfaccia ghiaccio/acqua in soluzione nei campioni, delle prove batch e a flaconi sospesi, processati a parità di temperatura di nucleazione. Tale ipotesi è giustificata dai differenti risultati ottenuti nell'analisi d'attività biologica di LDH, delle prove in questione, esposti nel paragrafo 3.6. Nel quale si chiarisce la relazione tra stabilità proteica e la formazione dell'interfaccia ghiaccio/acqua in soluzione durante il processo di congelamento.

Attraverso l'integrazione nel tempo delle potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento esposte in Figura 3.17 si sono ricavate le corrispettive quantità di calore di accrescimento. Quest'ultime vengono illustrate in Figura 3.18, in funzione del tempo o meglio del protocollo di congelamento utilizzato post nucleazione (fase di mantenimento 45min, successiva fase di congelamento rampa-ripiano). Graficamente si è individuato in ogni curva l'istante in cui avviene il cambiamento di pendenza, corrispondente al fatto che la soluzione risulta essere completamente congelata. L'obiettivo consiste nell'individuare il tempo al quale avviene il completo congelamento delle soluzioni nelle differenti prove.

La quantità di calore è stata normalizzata rispetto al valore in cui si registra tale variazione di pendenza e la metodica di calcolo, insieme a eventuali considerazioni fatte, sono riportate nel paragrafo 2.6 capitolo 2.



**Figura 3.18-** Calori di accrescimento termici relative alle prove di congelamento 1b e 1s; (b) Calori di accrescimento termico relativi alle prove di congelamento 3b e 3s; (c) Calori di accrescimento termico relative alle prove di congelamento 2b e 2s; Le curve di potenza in rosso sono relative alla configurazione a flaconi in sospenso, mentre in nero alla configurazione batch; Protocolli di congelamento corrispettivo ad ogni prova effettuata è visualizzabile in Tabella 2.4 capitolo 2

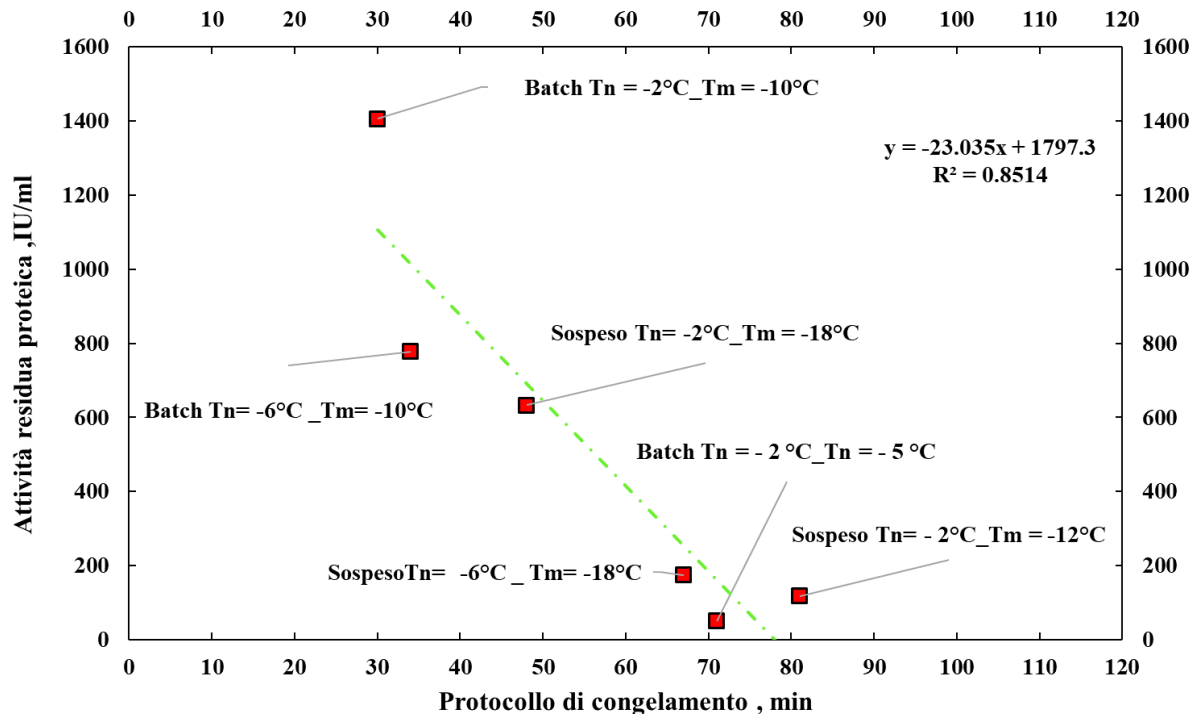
Dai risultati esposti in Figura 3.18 si può evincere come, tutte le soluzioni processate nelle prove batch completano il processo di congelamento, a parità di condizioni utilizzate (valori di  $T_n$  e  $T_m$ ), in tempi più brevi rispetto alle corrispettive prove effettuate in modalità sospesa. Per una migliore visione dei dati si riportano in Tabella 3.7 i tempi di congelamento delle soluzioni corrispettivi alle condizioni di processo utilizzate, temperatura di nucleazione e di mantenimento, nelle differenti prove di congelamento effettuate.

*Tabella 3.7- Tempi di congelamento delle soluzioni corrispettive alle prove a differente configurazione e protocollo di processo*

<b>Configurazione</b>	<b>N ~ Prova</b>	<b><math>T_n</math> °C</b>	<b><math>T_m</math> °C</b>	<b>Tempo di congelamento min</b>
<b>BATCH</b>	1b	-2°C	-5°C	61
	2b	-6°C	10°C	34
	3b	-2°C	10°C	27
<b>SOSPESO</b>	1s	-2°C	12°C	81
	2s	-6°C	18°C	67
	3s	-2°C	18°C	48

Dall' analisi dei risultati riportati in Tabella 3.7 si nota come, il processo di congelamento delle soluzioni appartenenti alle prove batch 2b e 3b si completa ampiamente in fase di mantenendo. Nella prova batch 1b al contrario come viene illustrato in Figura 3.18 (a) il calore di accrescimento scambiato tra ripiano-flaconi è praticamente nullo in tutta la fase di mantenimento (primi 45 minuti post-nucleazione), per poi accrescersi repentinamente una volta abbassata la temperatura del ripiano fino a -45 °C. Quindi in tal caso come si evince dal dato in Tabella 3.7 il congelamento della soluzione processata nella prova batch 1b avviene a posteriori la fase di mantenimento, ovvero nello step di rampa con il raffreddamento della temperatura di ripiano. Anche per le soluzioni processate in modalità a flaconi in sospeso, appartenenti alle prove 1s e 2s, si registra il medesimo risultato. Ovvero il processo di congelamento e anche di accrescimento cristallino, inizia seppur minimamente in fase di a mantenimento ma si completa soltanto successivamente nello step di raffreddamento rampa-ripiano. Risultato leggermente differente riguarda le soluzioni appartenenti alla prova in sospeso 3s in cui, come risulta in Tabella 3.6, il processo di congelamento termina poco dopo rispetto al periodo corrispondente alla fase di mantenimento. Questo fa supporre che, in tale step, nella prova a flaconi sospesi 3s è avvenuto uno scambio termico tra i flaconi e il ripiano, ma sicuramente inferiore rispetto alla corrispettiva prova batch 3b, come si evince dai dati in Tabella 3.17 e in Figura 3.18 (b), svolta a parità di condizioni di congelamento (ovvero medesima temperatura di nucleazione).

Si riporta adesso in Figura 3.19 un interessante relazione che lega i tempi di congelamento (esposti in Tabella 3.7) relativi alle soluzioni processate nelle differenti prove con i risultati corrispettivi relativi all'attività biologica di LDH (riportati nel paragrafo 3.6 in Figura 3.13).



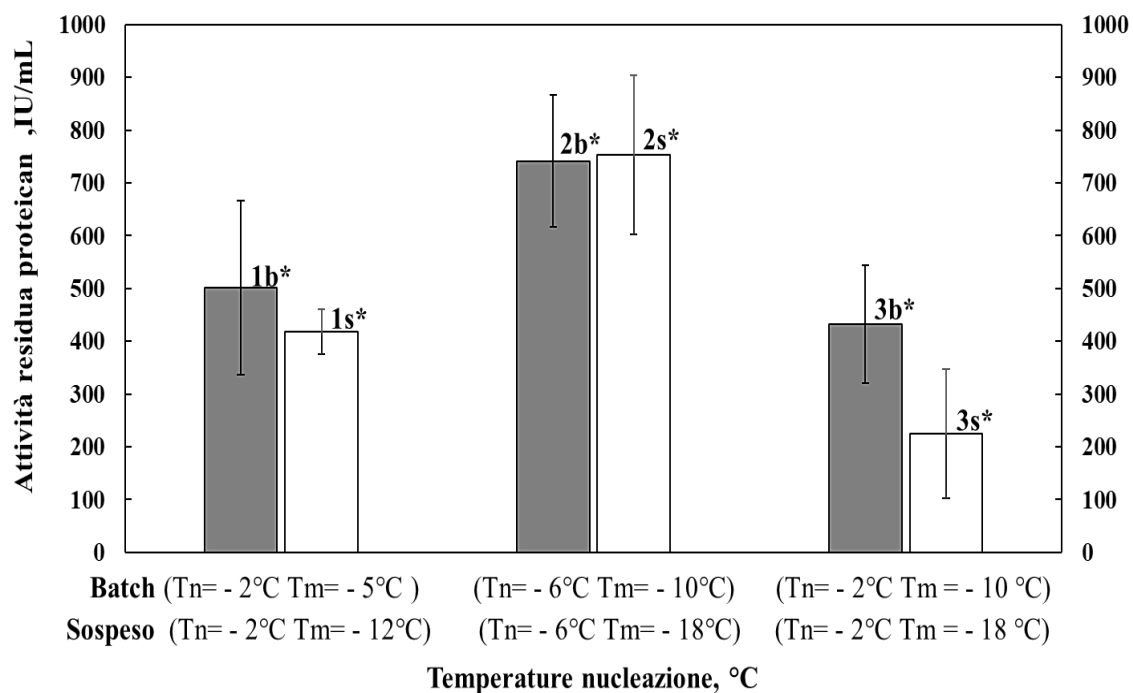
**Figura 3.19-** relazione lineare tra l'attività biologica di LDH e i tempi di congelamento nelle soluzioni processate nelle varie prove effettuate in configurazione a flaconi in sospeso e in configurazione batch. Le i protocolli di congelamento delle seguenti prove (1b,2b,3b,1s,2s,3s) sono illustrati in Tabella 2.4.

Si osserva in Figura 3.19 una chiara correlazione tra i tempi ai quale avviene il completo congelamento delle soluzioni nelle differenti prove e l'attività residua di LDH espressa secondo unità internazionali IU/mL. È chiaro come, in Figura 3.19, nelle prove (2b,3b e 3s) in cui il processo di accrescimento cristallino e di congelamento della soluzione, è stato completato all'incirca nella fase di mantenimento (primi 45 minuti del protocollo di congelamento post nucleazione), si sono registrati dei valori alti valori d'attività residua proteica. Al contrario nelle prove (1b,1s,2s) in cui il congelamento della soluzione si è completato in fase di rampa di raffreddamento con il ripiano, dopo i 45 minuti dello step di mantenimento, si sono registrati dei valori dei bassi valori d'attività residua proteica. Inoltre dai risultati riguardante le analisi d'attività biologica di LDH, illustrate in Figura 3.13 paragrafo 3.6, si evince come, le prove svolte in modalità batch presentino una attività residua proteica in media più alta rispetto al caso a flaconi sospesi. Questo può essere spiegato considerando che i tempi di congelamento dei prodotti nelle prove in sospeso risultano essere, a parità di temperatura di nucleazione, superiori rispetto alle prove svolte in modalità batch. Il tutto sembra indicare che anche il tempo di contatto dell'enzima con l'interfaccia, oltre che la sua estensione totale, abbia un ruolo fondamentale. Da recenti studi riportati in letteratura da (Li, et al., 2019), si attesta come il principio proteico durante la fase di congelamento non entri direttamente in contatto con la superficie di ghiaccio, attraverso l'adsorbimento e successiva denaturazione, ma bensì con uno strato di film "quasi-liquido" che si interpone tra l'interfaccia ghiaccio/acqua. Si suppone come

l'enzima entrando in contatto, per determinati istanti di tempo, con lo strato "quasi-liquido" venga esposto a differenti stress denaturanti, uno dei quali ad esempio consiste nell'aumento dell'acidità locale a causa della carica negativa sulla superficie dei cristalli di ghiaccio (LDH è stabile a pH neutro). Tale ipotesi valorizza ancora di più i risultati esposti in Figura 3.19, in cui si suppone che la stabilità biologica del LDH sia influenzata anche dal tempo di contatto della proteina con l'interfaccia ghiaccio/acqua durante tutto il processo di congelamento. La medesima considerazione viene anche convalidata da attuali studi riportati in letteratura da (Fang, et al., 2020). Tali studi attestano, attraverso prove di congelamento svolte con controllo della temperatura di nucleazione, come la stabilità proteica dell'ormone della crescita IgG non è solo influenzata dalla formazione dell'interfaccia ghiaccio/acqua, generata ad una determinata T<sub>n</sub>, ma anche dal tempo della fase di mantenimento e dal protocollo di congelamento (velocità di raffreddamento rampa-ripiano) utilizzato post nucleazione. Si evidenzia in (Fang, et al., 2020) ,ciò che viene attestato anche in Figura 3.19, come la lunga permanenza del principio enzimatico in una soluzione non del tutto congelata, ne comporta l'aggregazione proteica durante il processo di congelamento. In aggiunta ai fattori inerenti alla stabilità proteica gli studi eseguiti da (Fang, et al., 2020) , affermano un'altra considerazione riportata anche nel progetto di tesi. Ovvero che la morfologia dell'interfaccia ghiaccio/acqua non è solo influenzata dalla temperatura a cui avviene il fenomeno di nucleazione in soluzione, ma anche dalla storia termica della formulazione post processo di nucleazione.

### **3.8 Analisi dell'attività biologica di LDH post liofilizzazione**

La stabilità biologica del LDH (lattato deidrogenase), oltre ad essere presa in esame attraverso prove di congelamento, è stata analizzata anche mediante cicli di liofilizzazione completi che hanno previsto entrambe le fasi di essiccamento primario e secondario. Le prove sperimentali effettuate riguardano cicli in configurazione batch (1b\*,2b\*,3b\*) e cicli svolti in modalità a flaconi sospesi (1s\*,2s\*,3s\*). I protocolli di congelamento utilizzati sono differenti per le diverse prove e riportati in Tabella 2.4 (medesimi alle prove di congelamento). Mentre il protocollo in fase di essiccamento utilizzato è il medesimo per tutte le prove effettuate e viene riportato in Tabella 2.5. Si ricorda che la soluzione processata in tali prove di liofilizzazione riguarda 0.01 mg/mL di LDH in buffer citrato 10 mM a 6.5 pH con una concentrazione di saccarosio pari 5% w/w. In Figura 3.20 vengono riportati i risultati relativi all'analisi d'attività biologica di LDH svolta sui campioni liofilizzati appartenenti a prove con diversa configurazione (batch e flaconi sospesi) e differenti protocolli di congelamento.



**Figura 3.20-** Analisi Attività residua enzimatica in funzione del protocollo utilizzato in fase di congelamento, per le prove di liofilizzazione svolte in modalità a flaconi in sospeso 1s\*,2s\*,3s\* (Barre bianche) e in configurazione Batch,1b\*,2b\*,3b\* (Barre Grigie).

In Figura 3.20 si osserva come i dati ottenuti dall'analisi di LDH nelle prove di liofilizzazione non rispecchiano i corrispettivi risultati illustrati in Figura 3.13 riguardanti le prove di congelamento. In fatti la prova di liofilizzazione batch 3b\*, svolta con condizioni di  $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -10^\circ\text{C}$ , non risulta riportare la più alta attività residua biologica tra i cicli svolti, contrariamente a quanto si attestava nei risultati riguardanti le prove di congelamento in Figura 3.13. Infatti svolgendo un confronto dell'analisi dei dati delle prove batch 1b\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -5^\circ\text{C}$ ) e 3b\*, si riporta un valore di significatività (p-value) pari a 0.41. Essendo, tale valore, superiore al valore limite 0.05, verifica l'opzione di "null", ovvero le due distribuzioni di dati relativi all'analisi d'attività enzimatiche nelle due prove (1b\* e 3b\*) sono identici. Ciò significa che i risultati d'attività biologiche riportati in Figura 3.20 delle prove di liofilizzazione 1b\* e 3b\* sono medesimi. Il calcolo del p-value viene svolto anche per le prove a flaconi in sospeso 1s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -12^\circ\text{C}$ ) e 3s\* ( $T_n = -2^\circ\text{C}$  e  $T_m = -18^\circ\text{C}$ ) registrando un valore pari a 0.65. Anche in questo essendo tale valore superiore a 0.05, verifica che i risultati d'attività enzimatica riportati in Figura 3.20 per le prove di liofilizzazione sono essenzialmente uguali. Il tutto significa che l'abbassamento della temperatura di ripiano nella fase di mantenimento nelle prove batch 3b\* e a flaconi in sospeso 3s\*, rispetto alle corrispettive prove svolte a medesima  $T_n$  (1b\* e 1s\*), non porta nessun miglioramento sulla stabilità enzimatica a fine ciclo di liofilizzazione. Tale risultato è discorde con i dati riguardanti la stabilità del LDH nelle prove di congelamento, esposti in Figura 3.13 e commentati nel paragrafo 3.6. Inoltre in Figura 3.20 si osserva come, le prove che registrano dei valori d'attività enzimatica più alti risultano essere il ciclo batch 2b\* e il ciclo a flaconi sospesi 2s\* aventi entrambi una temperatura di nucleazione dei prodotti minore, rispetto alle altre prove, e pari a  $T_n$ . Questo dato contraddice la relazione estensione interfaccia ghiaccio/acqua e stabilità proteica commentati nel paragrafo 3.6 riguardante i risultati delle prove di congelamento. Dunque i dati registrati per le prove di liofilizzazione risultano di difficile comprensione in quanto in letteratura è noto come la

maggior parte degli stress che influenzano la stabilità proteica in soluzione sono presenti in fase di congelamento rispetto alle fasi di essiccamento (Wang, 2000). Tale considerazione viene contraddetta dai dati di letteratura riportati da (Jiang & Nail, 1998), in cui si afferma come l'attività residua di LDH in un ciclo di liofilizzazione, con una determinata formulazione, viene anche influenzata da fattori quali il collasso strutturale durante la fase di essiccamento primario e la percentuale residua d'umidità nel prodotto essiccato determinata dalla fase di essiccamento secondario.

In particolare studi condotti da (Pikal, et al., 1992), dimostrano come la degradazione proteica viene influenzata dalla presenza di un determinato quantitativo d'umidità residua all'interno dei prodotti liofilizzati e dal volume d'ossigeno situato nello spazio di testa dei flaconi. Si verifica come bassi valori di umidità residua con minime quantità d'ossigeno nello spazio di testa nei flaconi liofilizzati, preservano la stabilità proteica, specialmente in formulazioni in cui vi è contenuto anche un eccipiente (es. Saccarosio). Questo perché, a parità di contenuto d'ossigeno, le reazioni ossidative, che causano la degradazione proteica, sono limitate all'interfaccia acqua/aria, sulla superficie dell'eccipiente, se il residuo d'umidità all'interno del prodotto liofilizzato non risulta eccessivo. Tale ipotesi viene riscontrata nel progetto tesi in quanto le prove di liofilizzazione aventi maggiore attività residua biologica (in Figura 3.20), ovvero il ciclo batch 2b\* e a flaconi sospeso 2s\*, risultano anche avere, tramite titolazione Karl Fischer, un minore residuo d'umidità specifica all'interno dei prodotti finiti (come illustrato in Figura 3.11 paragrafo 3.5).

Infine in Figura 3.20 si osserva come la differenza nei risultati d'attività proteica tra le singole prove di liofilizzazione, svolte nelle due modalità batch e a flaconi sospesi a parità di temperatura di nucleazione, si sia livellata, rispetto a quanto riscontrato tramite le prove di congelamento. Questo fa supporre che l'aggiunta delle fasi di essiccamento (primario e secondario) pareggi il gap relativo ai diversi tempi di congelamento delle soluzioni nelle differenti prove in sospeso, facendo sì che a fine di un intero ciclo di liofilizzazione in realtà non si riscontra una sostanziale differenza di residuo d'attività proteica all'interno dei campioni processati nelle due modalità. Tale aspetto risulta importante in ottica di realizzazione di un processo di produzione in continuo, anche se necessita ulteriori approfondimenti, per quanto riguarda lo svolgimento di un intero ciclo di liofilizzazione.



## 4. Conclusioni

Nel progetto di tesi si è posto a confronto il sistema tradizionale di liofilizzazione farmaceutica batch con una configurazione di processo innovativa e continua a flaconi a sospesi. Per questo fine si sono effettuate diverse prove sperimentali e valutati differenti parametri di processo per individuare quali fossero le principali differenze tra le due configurazioni. I termini di valutazione analizzati nelle differenti prove sperimentali riguardano: tempi di sublimazione dei prodotti durante l'essiccamento, valori di on-set e off-set, analisi di umidità residua mediante titolazione Karl Fischer e infine analisi d'attività biologica di una soluzione contenete LDH (proteina campione), processata in diversi cicli di congelamento e liofilizzazione svolti in entrambe le modalità con differenti protocolli in fase di congelamento.

Il progetto principale di tesi ha riguardato prove di congelamento di una soluzione contenente 0.01 mg/ml di LDH (lattato deidrogenase) in tampone citrato 10 mM a pH 6.5, ed in presenza di 5% w/w di saccarosio. Durante il processo di congelamento, per entrambe le configurazioni, è stata applicata una tecnica di controllo della nucleazione (VISF, vacuum induced surface freezing) per indurre la formazione di nuclei a due diverse temperature ( $T_n = -2^\circ\text{C}$  oppure  $-6^\circ\text{C}$ ). Successivamente è stata applicata una fase di "mantenimento" ad un secondo valore di temperatura  $T_m$  (di nuovo cambiato nelle varie prove), per promuovere la formazione di grossi cristalli di ghiaccio, prima di procedere con una rampa a  $-45/-50^\circ\text{C}$ . Si è osservato che la combinazione di una temperatura di nucleazione alta ( $T_n = -2^\circ\text{C}$ ) con una  $T_m$  sufficientemente bassa ( $-10^\circ\text{C}$  per il batch,  $-18^\circ\text{C}$  per la modalità sospesa), risulta ottimale. In tali condizioni, l'alta temperatura di nucleazione permette la generazione di grossi cristalli di ghiaccio, e la bassa temperatura di mantenimento del ripiano evita possibili fenomeni di melting back. Ciò minimizza la possibilità per la proteina di adsorbirsi all'interfaccia acqua/ghiaccio, e quindi denaturarsi. In generale nelle differenti prove di congelamento effettuate nelle due modalità di processo si è verificato (in Figura 3.13), come le prove in configurazione batch, a parità di protocollo di congelamento  $T_n$  e  $T_m$  hanno riportato dei valori d'attività residua biologica di LDH superiori rispetto alle corrispettive prove svolte in modalità sospesa. Tale aspetto è stato indagato mediante studi riguardanti lo scambio termico tra flaconi e ripiano nella fase di congelamento in entrambe le due configurazioni e nelle differenti prove (con diversi valori di processo  $T_n$  e  $T_m$ ). Scegliendo opportunamente le condizioni operative, le due configurazioni di processo possono riprodurre il medesimo scambio termico ripiano-prodotto in fase di congelamento. In questo progetto tesi, si è scelto però di condurre le prove a flaconi sospesi in modo che avessero basse velocità di congelamento. Dai risultati riguardanti l'analisi termica si è osservata l'esistenza di una interessante correlazione tra l'attività residua enzimatica e la durata della fase di congelamento (Figura 3.19).

Si verifica come il tempo di contatto dell'enzima con l'interfaccia, oltre che la sua estensione totale, abbia un ruolo fondamentale durante l'intera fase di congelamento. Infatti la differenza nei risultati d'attività proteica tra le due configurazioni viene spiegata considerando che i tempi

di congelamento dei prodotti nelle prove in sospenso risultano essere, a parità di temperatura di nucleazione, superiori rispetto alle prove svolte in modalità batch.

Si sono svolte prove di liofilizzazione in entrambe le due modalità con la medesima soluzione contenete il principio proteico e gli stessi protocolli di temperatura svolti nelle prove di congelamento. L'obiettivo consisteva nel valutare l'attività biologica della proteina campione (LDH) a fine di cicli di liofilizzazione completa svolti in entrambe le modalità e protocolli di congelamento differenti. I risultati d'attività biologica di LDH riscontrati nelle diverse prove di liofilizzazione risultano essere differenti rispetto alle corrispettive prove di congelamento svolte con i medesi parametri di processo ( $T_n$ ,  $T_m$ ). In tale analisi si spiega come in realtà il residuo d'attività enzimatica nei prodotti liofilizzati, non sia solo influenzato dagli stress inerenti alla fase di congelamento della soluzione; ma anche da parte delle fasi di essiccamento primario e specialmente secondario con una più che probabile relazione tra stabilità proteica e residuo d'umidità specifica all'interno del prodotto finale.

Successivamente si sono svolte prove di liofilizzazione sempre nelle due configurazioni, in cui si è mantenuto lo stesso protocollo di congelamento ( $T_n = -2C^\circ$ ), ma si è utilizzato soluzioni di buffer citrato 10mM a pH 6.5, con differenti concentrazioni di saccarosio pari al 5%,10% e 15% w/w. Le analisi svolte hanno riguardato la durata dell'essiccamento primario e la differenza tra i tempi di onset e offset. Si è osservato come il tempo di sublimazione dei prodotti durante il primario risulta essere inferiore nel caso della configurazione a flaconi in sospenso, rispetto al modello batch. Questo risultato conferma che la fase di essiccamento primario in un ciclo di produzione potrebbe essere ridotta di almeno 2h attraverso l'utilizzo di una modalità di processo in continuo. Inoltre si è dimostrato come l'utilizzo di una modalità di processo a flaconi sospesi porti alla realizzazione di un prodotto liofilizzato più omogeneo e uniforme. In quanto le differenze tra i tempi di onset e offset delle prove in configurazione a flaconi in sospenso risulta essere minore rispetto ai cicli effettuati in modalità batch. Si sono infine condotte analisi riguardanti l'utilizzo della tecnica di titolazione Karl Fischer per la valutazione del residuo d'umidità specifica in tutte le prove di liofilizzazione effettuate. Attraverso l'analisi dei dati d'umidità delle differenti prove si sono estrapolate informazioni riguardo le formulazioni utilizzate e i protocolli di processo svolti, inerenti sia alla fase di congelamento che alla fase di essiccamento, con eventuali valutazioni anche su possibili fenomeni di microcollasso nei prodotti processati.

In conclusione dal lavoro di tesi si sono riscontrati risultati interessanti mettendo a confronto, le due configurazioni batch e flaconi in sospenso, in diversi punti e parametri di processo. In particolare si è analizzata la stabilità proteica del LDH in diverse prove di congelamento nelle due configurazioni, andando a valutare quali fossero le differenze sostanziali attraverso analisi di scambio termico ed estrapolando i tempi di congelamento della soluzione (contenete l'enzima) processata nei diversi cicli. Studi futuri potrebbero riguardare l'implementazione di tale tematica, per entrambe le configurazioni di processo, dato che si è già riscontrato come l'attività enzimatica durante la fase di congelamento non è solo influenzata dalla formazione dell'interfaccia ghiaccio/acqua generata ad una determinata  $T_n$ , ma anche dal tempo della fase di mantenimento e dal protocollo di congelamento (velocità di raffreddamento rampa-ripiano) utilizzato nella fase di post nucleazione.

## Lista dei simboli

$\Delta G$	Variazione d'energia libera di Gibbs
$\Delta G_s$	Variazione d'energia libera di Gibbs contributo superficiale
$\Delta G_v$	Variazione d'energia libera di Gibbs contributo legato al volume
$r^*$	Raggio critico particellare
$A_p$	Aria interna del prodotto
$R_p$	Resistenza al flusso di vapore costituita dallo strato di torta essiccato
$P_c$	Pressione interna alla camera di liofilizzazione
$p_{w,i}$	Tensione di vapore superficiale del ghiaccio
$p_{w,c}$	Pressione parziale dell'acqua all'interno della camera
$T_R$	Temperatura ripiano
$T_{ice}$	Temperatura interfaccia superficiale ghiaccio
$T_p$	Temperatura del prodotto congelato
$T_g$	Temperatura di transizione vetrosa
$T_{eu}$	Temperatura eutettica
$T_c$	Temperatura di collasso
$T_n$	Temperatura di nucleazione
$T_m$	Temperatura di mantenimento
$T$	Temperatura Termocoppia
$N$	Numero prova
<b>OD</b>	Valori d'assorbanza
$\Delta A_{450}$	Differenza d'assorbanza tra il valore al tempo finale e il valore al tempo iniziale

$B$	Valore di NADH generato in ogni pozzetto tra il tempo finale e iniziale d'analisi
$V$	Volume di campione aggiunto all' interno dei pozzetti
$g_{H2O}$	Massa d'acqua totale
$g_s$	Massa solida essiccata
$S$	Massa solvente iniettata
$E$	Valore della massa d'acqua contenuta nel campione liofilizzato
$C$	Massa di soluzione inserita nella cella di titolazione Karl Fischer
$m_p$	Massa prodotto processato
$C_{p,liqui}$	Calore specifico soluzione liquida
$C_{p,ghiaccio}$	Calore specifico dell' ghiaccio
$X_{ghiaccio}$	Frazione di Ghiaccio in soluzione
$V_{liq}$	Volume soluzione liquida
$\rho_{liq}$	Densità liquida soluzione
$U$	Coefficiente di scambio termico globale
$U_{sospeso}$	Coefficiente di scambio globale per la configurazione a flaconi in sospeso
$U_{batch}$	Coefficiente di scambio globale per la configurazione batch
$\dot{Q}_{esterna}$	Potenza termica spuria fornita dalle pareti per irraggiamento
$\dot{Q}_{acc}$	Potenza di calore effettiva generata dal fenomeno di accrescimento
$\dot{Q}_{Ripiano}$	Flusso termico di calore scambiato tra flacone e ripiano
$Q_{acc}$	Quantità di calore di accrescimento scambiata
$Q_R$	Calore irradiato dalle pareti

## **Abbreviazioni**

FDM	Freeze-Drying Microscope
DSC	Differenzial Scanning Calorimetry
LDH	Lattato deidrogenanasi
IgG	Ormone della crescita
MAK066	Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit



## Elenco Figure

<b>Figura 1.1-</b> Presente & Futuro nel settore farmaceutico; Figura modificata da (Pisano, et al., 2019).....	2
<b>Figura 1.2-</b> Schema generale di un processo di liofilizzazione.....	3
<b>Figura 1.3-</b> Diagramma di fase dell'acqua con illustrato il percorso delle tre fasi della liofilizzazione .....	3
<b>Figura 1.4-</b> Diagramma di stato acqua /soluto modificata da (Kasper & Friess, 2011).....	6
<b>Figura 1.5-</b> Profilo dell'energia libera di Gibbs in funzione del raggio particellare (figura adattata con modifiche da (Zhang & Xiang, 2014)).....	7
<b>Figura 1.6-</b> Profilo di temperatura prodotto farmaceutico durante la fase di congelamento. Figura adattata da (Kasper & Friess, 2011).....	8
<b>Figura 1.7-</b> Profilo termico di congelamento di una soluzione 10 (mM) di buffer citrato a Ph 6.5 con 5% in peso di saccarosio con applicazione VISF per il controllo della temperatura di nucleazione a -5 °C. ....	11
<b>Figura 1.8-</b> Processo essiccamento primario. Immagine modificata da (Kawasaki, et al., 2019) .....	14
<b>Figura 1.9-</b> Tempi di Processo Batch Vs Continuo figura modifica da (Capozzi, et al., 2019) .....	15
<b>Figura 1.10-</b> Componenti di un impianto di liofilizzazione Batch Figura modificata modifiche da (Franks & Auffret, 2007).....	16
<b>Figura 1.11-</b> Impianto di liofilizzazione continuo a flaconi sospesi immagine modificata da (Pisano, et al., 2019).....	17
<b>Figura 1.12-</b> Scambio termico in fase di congelamento delle configurazioni: Batch (1); Continua a flaconi sospesi (2). ....	18
<b>Figura 1.13-</b> Conformazione Batch durante la fase di essiccamento primario. Differenza di intensità di flusso irradiato di calore tra i flaconi esterni e interni. ....	19
<b>Figura 2.1-</b> Rappresentazione fase di collasso attraverso FDM di una soluzione 4% in peso di saccarosio. Immagine modificata da (Bjelošević, et al., 2018).....	24
<b>Figura 2.2-</b> Immagine del FDM utilizzato per le analisi di caratterizzazione termica Dipartimento di scienze applicate (DISAT) del Politecnico di Torino .....	25
<b>Figura 2.3-</b> Configurazioni utilizzate durante le prove di congelamento, nel riquadro blu viene raffigurata la modalità a flaconi sospesi, nel riquadro rosso la configurazione batch. ....	27
<b>Figura 2.4-</b> A destra liofilizzatore utilizzato durante le prove di congelamento e liofilizzazione; a sinistra il software utilizzato per la gestione delle procedure e il funzionamento dei macchinari; .....	30
<b>Figura 2.5-</b> Immagine Flaconi liofilizzati: 12 campioni in prima fila contenenti LDH destinati all'analisi d'attività proteica; 5 flaconi privi di proteina destinati all'analisi d'umidità residua .....	31

<b>Figura 2.6-</b> Metodica di diluizione 6 flaconi 4R in prima fila;6 Flaconi R corrispondenti in seconda fila.....	10 36
<b>Figura 2.7-</b> Immagine piastra; Fila A dedicata alla retta di taratura del NADH Standard; Dalla seconda fila in giù, pozzetti dedicati all'analisi d'attività enzimatica delle prove di congelamento e liofilizzazione.....	37
<b>Figura 2.8-</b> Retta di taratura NADH Standard .....	37
<b>Figura 2.9-</b> Sulla sinistra immagine Karl Fischer (apparecchiatura DISAT); sulla destra illustrazione componentistiche immagine modificata (Koch, et al., 2007).....	39
<b>Figura 2.10-</b> Frazione di ghiaccio in funzione della temperatura. Immagine modificata da (Arsiccio, et al., 2019).....	45
<b>Figura 2.11-</b> Potenza termica di accrescimento calcolata per una prova batch durante il processo di congelamento a $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ . Il metodo dei trapezi composto è stato usato per il calcolo della quantità di calore scambiato. ....	46
<b>Figura 2.12-</b> Quantità di calore di accrescimento scambiato durante una prova batch a $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ . Il triangolo nero con bordo rosso rappresenta il punto di fine del congelamento. ....	46
<b>Figura 2.13-</b> Rappresentazione valori on-set e off-set on una curva di rapporto Pirani Baratron per una prova a flaconi sospeso con $T_n= -5\text{ }^\circ\text{C}$ al 5% di saccarosio in peso di saccarosio. ....	48
<b>Figura 2.14-</b> Profilo termico della prova a flaconi in sospeso $T_n = -2\text{ }^\circ\text{C}$ $T_m = - 5\text{ }^\circ\text{C}$ durante essiccamento primario; Massima temperatura prodotto congelato ricavata graficamente. ....	49
<b>Figura 3.1 -</b> Risultati analisi DSC soluzione di saccarosio 5% w/w .....	52
<b>Figura 3.2 -</b> Risultati analisi DSC soluzione saccarosio 10% w/w .....	52
<b>Figura 3.3-</b> Risultati analisi DSC soluzione saccarosio 15% w/w .....	53
<b>Figura 3.4-</b> raffigurazione dell'andamento del fronte di sublimazione di una soluzione al 5% di saccarosio w/w in buffer citrato 10mM pH 6.5.....	54
<b>Figura 3.5-</b> Raffigurazione dell'andamento del fronte di sublimazione di una soluzione al 10% w/w di saccarosio in buffer citrato 10mM a pH 6.5.....	55
<b>Figura 3.6-</b> Tempo di durata essiccamento primario in funzione del protocollo di temperatura utilizzato durante la fase di congelamento delle differenti prove di liofilizzazione svolte. Le prove in modalità batch 1b*( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-5\text{ }^\circ\text{C}$ ); 2b*( $T_n=-6\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ );3b* ( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ ). Le prove in modalità sospesa 1s* ( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-12\text{ }^\circ\text{C}$ );2s* ( $T_n=-6\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-18\text{ }^\circ\text{C}$ ); 3s* $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-18\text{ }^\circ\text{C}$ ); .....	57
<b>Figura 3.7-</b> Differenza valori di Offset e Onset per le diverse prove di liofilizzazione. Tempo di durata essiccamento primario in funzione del protocollo di temperatura utilizzato durante la fase di congelamento delle differenti prove di liofilizzazione svolte. Le prove in modalità batch 1b*( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-5\text{ }^\circ\text{C}$ ); 2b*( $T_n=-6\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ ); 3b* ( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-10\text{ }^\circ\text{C}$ ).Le prove in modalità sospesa 1s* ( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-12\text{ }^\circ\text{C}$ ); 2s* ( $T_n=-6\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-18\text{ }^\circ\text{C}$ );3s* ( $T_n=-2\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_m=-18\text{ }^\circ\text{C}$ ); .....	57
<b>Figura 3.8-</b> Tempo di durata dell'essiccamento primario in funzione delle soluzioni con percentuale in peso di saccarosio differente, utilizzate nelle prove di liofilizzazione a configurazione batch e a flaconi in sospeso. ....	59
<b>Figura 3.9-</b> Differenza valori di OffSet e OnSet per le diverse prove svolte in configurazione batch e a falconi in sospeso con soluzioni aventi percentuali di saccarosio in peso differenti 60	



<b>Figura 3.10-</b> Variazione della massima temperatura del Prodotto congelato in fase di essiccamento primario, nelle prove a differente concentrazione di soluto in soluzione .....	63
<b>Figura 3.11-</b> Analisi d'umidità residua specifica delle prove di liofilizzazione, svolte con una metodica di congelamento differente; Le barre grigie sono relative alle prove batch, quelle bianche alle prove svolte in modalità a flaconi sospesi. ....	65
<b>Figura 3.12-</b> Analisi d'umidità residua specifica delle prove di liofilizzazione aventi soluzioni con differente concentrazione di soluto w/w; Le barre grigie sono relative alle prove batch, Le barre bianche sono relative alle prove svolte a flaconi in sospeso.....	67
<b>Figura 3.13-</b> Analisi attività residua enzimatica in funzione del protocollo di congelamento utilizzato per prove svolte in modalità a flaconi in sospeso 1s,2s,3s (Barre rosse) e in configurazione Batch,1b,2b,3b (Barre Blu). ....	69
<b>Figura 3.14-</b> Risultati attività residua proteica illustrati secondo protocollo di congelamento ( $T_n$ ); Prove batch a barre piene blu (2b e 3b in Tabella 3.5) in cui è avvenuto lo step di mantenimento e prove a barre tratteggiate (4b e 5b in Tabella 3.5) in cui non è avvenuto lo step di mantenimento.....	71
<b>Figura 3.15-</b> Risultati attività residua proteica illustrati secondo protocollo di congelamento ( $T_n$ ); Prove a flaconi sospesi piene rosse (2s e 3s in Tabella 3.5) in cui è avvenuto lo step di mantenimento e prove a flaconi sospesi barre tratteggiate (4s e 5s in Tabella 3.5) in cui non è avvenuto lo step di mantenimento.....	73
<b>Figura 3.16-</b> (a) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 1b e 1s; (b) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 3b e 3s; (c) Potenze termiche di accrescimento relative alle prove di congelamento 2b e 2s;Le curve di potenza in rosso sono relative alla configurazione a flaconi in sospeso, mentre in nero alla configurazione batch. ....	75
<b>Figura 3.17-</b> Calore di accrescimento calcolato nella fase di mantenimento per le prove di congelamento 1b,1s,2b,2s,3b,3s, condotte a differente protocollo di congelamento riportato in specifico in Tabella 2.4 capitolo 2; Le barre rosse sono indicative delle prove svolte in modalità sospesa, Le barre blu sono indicative delle prove svolte in modalità batch.....	77
<b>Figura 3.18-</b> Calori di accrescimento termici relative alle prove di congelamento 1b e 1s; (b) Calori di accrescimento termico relativi alle prove di congelamento 3b e 3s; (c) Calori di accrescimento termico relative alle prove di congelamento 2b e 2s;Le curve di potenza in rosso sono relative alla configurazione a flaconi in sospeso, mentre in nero alla configurazione batch; Protocolli di congelamento corrispettivo ad ogni prova effettuata è visualizzabile in Tabella 2.4 capitolo 2 .....	78
<b>Figura 3.19-</b> relazione lineare tra l'attività biologica di LDH e i tempi di congelamento nelle soluzioni processate nelle varie prove effettuate in configurazione a flaconi in sospeso e in configurazione batch. Le i protocolli di congelamento delle seguenti prove (1b,2b,3b,1s,2s,3s) sono illustrati in Tabella 2.4 Capitolo2. ....	80
<b>Figura 3.20-</b> Analisi Attività residua enzimatica in funzione del protocollo utilizzato in fase di congelamento, per le prove di liofilizzazione svolte in modalità a flaconi in sospeso 1s*,2s*,3s* (Barre bianche) e in configurazione Batch,1b*,2b*,3b* (Barre Grigie). ....	82

## Elenco Tabelle

<b>Tabella 1.1-</b> Effetto delle velocità di congelamento su alcuni parametri di processo .....	4
<b>Tabella 2.1-</b> Riassunto Campioni analizzati prove DSC .....	23
<b>Tabella 2.2-</b> protocollo utilizzato durante le prove DSC.....	24
<b>Tabella 2.3-</b> Protocollo eseguito per analisi FDM di soluzione di saccarosio al 5% e 10%...	26
<b>Tabella 2.4-</b> Parametri di processo prove congelamento .....	29
<i>Tabella 2.5-</i> Protocollo utilizzato post Nucleazione e Mantenimento nelle Prove di Liofilizzazione.....	32
<b>Tabella 2.6-</b> Formulazioni utilizzate durante Prove di Liofilizzazione a differente concentrazione di solido.....	33
<b>Tabella 2.7-</b> Procedura utilizzata per le Prove di Liofilizzazione a differente concentrazione di solido .....	34
<b>Tabella 2.8-</b> Formulazione Master Reaction .....	35
<b>Tabella 2.9-</b> Parametri utilizzati nell'Equazione (2.9) .....	42
<b>Tabella 3.1-</b> Valore di temperatura di transizione nelle differenti soluzioni.....	53
<b>Tabella 3.2-</b> Tempi di essiccamento primario e valori onset, offset per le configurazioni batch e a flaconi sospesi al variare delle condizioni di congelamento ( $T_n$ e $T_m$ ).....	56
<b>Tabella 3.3-</b> Risultati dei tempi di sublimazione e valori onset, offset; prove di liofilizzazione a differente concentrazione di soluto .....	59
<b>Tabella 3.4-</b> Temperatura massima raggiunta dal prodotto in fase di essiccamento primario	61
<b>Tabella 3.5-</b> Temperatura massima del prodotto congelato registrata per le prove di liofilizzazione con soluzioni a differenti concentrazioni di soluto .....	62
<b>Tabella 3.6-</b> Risultati analisi di attività residua enzimatica delle prove a differente protocollo di congelamento .....	69
<b>Tabella 3.7-</b> Tempi di congelamento delle soluzioni corrispettive alle prove a differente configurazione e protocollo di processo.....	79

## Bibliografia

- A. Barresi, A., Ghio, S., Fissore, D. & Pisano, R., 2009. Freeze drying of pharmaceutical excipients close to collapse temperature: influence of the process conditions on process time and product quality. *Drying Technology*, 27,805-8015.
- Andrieu, J., 2007. Freeze drying of pharmaceuticals in vials : influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 666-674.
- Arsiccio, A. et al., 2018. Vacuum induced surface freezing as an effective method for improved inter- and intra-vial product homogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, 211-219.
- Arsiccio, A., Giorsello, P., Marengo, L. & Pisano, R., 2019. Considerations on protein stability during freezing and Its impact on the freeze-drying cycle: a design space approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 464-475.
- Bjelošević, M., Trstenjak, K. B. & Logar, U., 2018. Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 292-302.
- Capozzi, L. C., Trout, B. L. & Pisano, R., 2019. From batch to continuous: freeze-drying of suspended vials for pharmaceuticals in unit-doses. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58, 1635-1649.
- Chang, B. S., Kendrick, B. S. & Carpenter, J. F., 1996. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1325-1330.
- Fang, R., Bogner, R. H., Nail, S. L. & Pikal, M. J., 2020. Stability of freeze-dried protein formulations: contributions of Ice nucleation temperature and residence time in the freeze-concentrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. in stampa <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.02.014>
- Fang, R. et al., 2018. Effect of controlled ice nucleation on stability of lactate dehydrogenase during freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107, 824-830.
- Feroz, J. & Susan, H., 2010. *Formulation Process Development Strategies For Manufacturing Biopharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Fissore, D., Pisano, R. & Barresi, A., 2019. *Freeze Dryinf of pharmaceutical Products*. CRC Press. Quebec, Canada.
- Franks, F. & Auffret, T., 2007. *Freeze-drying of Pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Gautam, A. & Pan, X., 2016. The changing model of big pharma: impact of key trends. *Drug Discovery Today*, 21,379-384.
- Gill, P. S., Sauerbrunn, S. R. & Reading, M., 1993. Modulated differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis*, 40, 931-939.
- Horn, J. & Friess, W., 2018. Detection of collapse and crystallization of saccharide , protein , and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Frontiers in Chemistry*, 6, 1-9.

- Jiang, S. & Nail, S. L., 1998. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, 249–257.
- Kasper, J. C. & Friess, W., 2011. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78, 248-263.
- Kasraian, K., Spitznagel, T. M., Juneau, J. A. & Yim, K., 1998. Characterization of the sucrose/glycine/ water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy. *Pharmaceutical Development and Technology*, 3, 233-239.
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T. & Shimanouchi, T., 2019. Recent development of optimization of lyophilization process. *Journal of Chemistry*, 2, 1-14.
- Khairnar, S. et al., 2013. A review on freeze drying process and pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 4, 76-94.
- Kiani, H. & Sun, D. W., 2011. Water crystallization and its importance to freezing of foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 407-426.
- Koch, M., Tenbohlen, S., Blennow, J. & Hoehlein, I., 2007. Reliability and improvements of water titration by the karl fischer technique. [www.semanticscholar.org/paper/Reliability-and-improvements-of-water-titration-by-koch-tenbohlen](http://www.semanticscholar.org/paper/Reliability-and-improvements-of-water-titration-by-koch-tenbohlen)
- Konstantinidis, A. K. et al., 2011. Controlled nucleation in freeze-drying : effects on pore size in the dried product layer , mass transfer resistance , and primary drying rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 3453-3470.
- Kramer, M., Sennhenn, B. & Lee, G., 2002. Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 433-443.
- Kristyn, G., Mircea, M. & j.Pikal, M., 2013. Accurate Prediction of Collapse Temperature using Optical Coherence Tomography-Based Freeze-Drying Microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 1773-1785.
- Li, J. et al., 2019. Interfacial stress in the development of biologics: fundamental understanding, current practice, and future perspective. *The AAPS Journal*, 1-17 in stampa. [DOI: 10.1208/s12248-019-0312-3]
- Liu, J., 2006. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: Techniques and applications in freeze-drying development. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11, 3-28.
- Meyer, L. D. et al., 2015. Evaluation of spin freezing versus conventional freezing as part of a continuous pharmaceutical freeze-drying concept for unit doses. *International Journal of Pharmaceutics*, 469, 2-10.
- Nireesha, G. R. et al., 2013. Lyophilization / freeze drying - an Review. *International journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, october, 3, 87-98.
- Oddone, I., A. Barresi, A. & Pisano, R., 2017. Influence of controlled ice nucleation on the freeze-drying of pharmaceutical products: the secondary drying step. *International Journal of Pharmaceutics*, 524, 134-140.
- Oddone, I., Bockstal, P.-j., VanBeer, T. D. & Pisano, R., 2016. Impact of vacuum-induced surface freezing on inter- and intra-vial heterogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 103, 167-178.

- Oddone, I., Pisano, R., Bullich, R. & Stewart, P., 2014. Vacuum-induced nucleation as a method for freeze-drying cycle optimization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53, 18236-18244.
- Oddone, I., Pisano, R., Bullich, R. & Stewart, P., 2014. Vacuum-induced nucleation as a method for freeze-drying cycle optimization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53, 18236-18244.
- Oddone, I., Van Bockstal, P. J., De Beer, T. & Pisano, R., 2016. Impact of vacuum-induced surface freezing on inter- and intra-vial heterogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 103, 167-178.
- Otero, L. & Sanz, P. D., 2000. High-pressure shift freezing. Part 1. Amount of ice instantaneously formed in the process. *Biotechnology Progress*, 16, 1030-1036.
- Patel, S. M., Bhugra, C. & Pikal, M. J., 2009. Reduced pressure ice fog technique for controlled ice nucleation during freeze-drying. *AAPS PharmSciTech*, 10, 1406-1411.
- Petzold, G. & Aguilera, J. M., 2009. Ice morphology: fundamentals and technological applications in foods. *Food Biophysics*, 4, 378-396.
- Pikal, M., Bogner, R. & Bhatnagar, B., 2007. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical development and technology*, 12, 505-523.
- Pikal, M. J., Dellerman, K. M. & K. Le Roy, M., 1992. Formulation and stability of freeze-dried proteins: effects of moisture and oxygen on the stability of freeze-dried formulations of human growth hormone. *Developments in biological standardization*, 74, 21-37.
- Pikal, M. J. & Shah, S., 1990. The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *International Journal of Pharmaceutics*, 62, 165-186.
- 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. *International Journal of Pharmaceutics*, 60, 203-207.
- Pisano, R., Arsiccio, A., Capozzi, L. C. & Trout, B. L., 2019. Achieving continuous manufacturing in lyophilization: technologies and approaches. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142, 265-279.
- Rambhatla, S., Ramot, R., Bhugra, C. & Pikal, M. J., 2004. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying : control and characterization of the degree of supercooling. *AAPS PharmSciTech*, 5, 1-9.
- Rey, L. & Rey, L., 2010. *Freeze Drying Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. PharmaceuTech, Inc. Pinehurst, North Carolina.
- Wang, . W., 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203, 1-60.
- Z.Jacobson, M., 2005. *Fundamentals of Atmospheric Modeling*. Cambridge University Press. New York, USA
- Zhang, T. H. & Xiang, Y. L., 2014. Experimental modelling of single-particle dynamic processes in crystallization by controlled colloidal assembly. *Chemical Society Reviews*, 4, 2324-2347.



# Ringraziamenti

La conclusione di questo lavoro di tesi corrisponde anche alla fine di un periodo della mia vita e della carriera universitaria da studente al Politecnico di Torino. Vorrei ringraziare tutte le persone che con la loro presenza e il loro supporto hanno contribuito alla realizzazione di tale elaborato.

In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore Il Prof. Roberto Pisano, per la sua professionalità, per i suoi indispensabili consigli, per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso di tesi e anche durante il percorso di studi universitari. Un ringraziamento particolare al Dott. Andrea Arsiccio e al Dott. Lorenzo Stratta, persone eccezionali che con immensa disponibilità e gentilezza mi hanno seguito in questi mesi, mettendo a disposizione la loro passione e la loro conoscenza. Con loro oltre ad un rapporto professionale è nata una bella amicizia.

Un grazie alla mia famiglia per aver sempre supportato le mie scelte e per essere stata al mio fianco in ogni situazione non facendomi mai sentire da solo. A mia madre, A mio padre e a mio fratello Antonio.

Un ringraziamento speciale a miei amici e colleghi di studio, Livio, Kita, Nicola, Federico, Ivan, Gaetano e Alessandro, per gli indimenticabili momenti trascorsi insieme, per esserci stati sempre, per avermi sempre supportato e consigliato il meglio in ogni situazione: grazie ragazzi, per me siete come fratelli, vi voglio bene.

Infine a tutti gli amici che hanno reso speciali questi anni al politecnico: Fede, Ted, Oana, Irene, Ambra, Adriana, Giordano, Mirko, Oussama e tutte le persone che hanno condiviso con me questo percorso di studi.

Grazie di cuore a tutti.