

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Uso di un micro-liofilizzatore per lo studio delle fasi del processo di liofilizzazione



Relatore

prof. Davide Fissore

Candidato

Andrés Marrero Krinitzky

Marzo 2021

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Liofilizzazione.....	1
1.1.1 Fase di congelamento e nucleazione spontanea e controllata.....	2
1.1.2 Fasi d'essicamento primario e secondario	8
1.2 Tecnologie analitiche di processo (PAT)	10
1.3 Parametri K_v e R_p	12
1.4 Considerazioni dello scale-up del processo	13
1.5 Micro-FD e Mini-FD.....	14
1.6 Obiettivi della Tesi	15
2. Metodologia e Materiali	16
2.1 Materiali utilizzati	16
2.2 Apparecchiatura e componenti utilizzati.....	17
2.2.1 Micro-FD	17
2.2.2 LyoPat®.....	22
2.3 Descrizione delle prove sperimentali	28
2.3.1 Calcolo di K_v e R_p	28
2.3.2 Procedure ed elenco delle prove sperimentali	30
3. Risultati e discussione	34
3.1 Studio dell'effetto della velocità congelamento con nucleazione spontanea.....	34
3.1.1 Effetto della concentrazione del prodotto.....	34
3.1.2 Effetto d'una sosta e la temperatura LyoSim durante il congelamento.....	37
3.2 Studio dell'effetto della velocità congelamento con nucleazione controllata.....	45
3.2.1 Influenza della temperatura di nucleazione	45
3.2.2 Influenza della velocità di raffreddamento	50
3.2.3 Influenza della temperatura del ripiano.	51
4. Conclusioni	52
5. Bibliografia	54
6. Notazioni.....	56

1. Introduzione

1.1 Liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo di grande interesse nella industria chimica degli alimenti e anche in quella farmaceutica, essendo adesso di vitale importanza nel processo di produzione di vaccini, e diventando quindi ancora più importante a causa della crisi mondiale che si affronta. La liofilizzazione è anche conosciuta come crioessiccamento poiché permette rimuovere l'acqua dai campioni congelati e a basse temperature tramite il processo di sublimazione, in questa maniera aumentando la conservabilità nel tempo dei prodotti essiccati. Il processo di liofilizzazione diventa molto importante per prodotti che normalmente non possono essere essiccati in condizioni di alta temperatura: questo processo si adatta bene a materiali molto termolabili, cioè che hanno la tendenza ad alterarsi sotto l'azione del calore (Pittino, 2015).

Nel caso della liofilizzazione di prodotti farmaceutici, dove si processa una soluzione acquosa con il principio attivo o prodotto (in genere proteine) di interesse disciolto in essa, si susseguono tre fasi che permettono di arrivare al prodotto essiccato senza danneggiare il principio attivo.

La prima fase è il **congelamento**, dove si porta la soluzione col prodotto di interesse al di sotto del suo punto di fusione (in genere fra $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$): qui ha luogo la nucleazione dei cristalli di ghiaccio e la loro crescita, fenomeno che è determinante per la struttura del prodotto essiccato e nelle seguenti fasi del processo.

La seconda fase è l'**essiccamento primario**, dove si porta il prodotto congelato a condizioni di bassa pressione dove inizia il processo di sublimazione del ghiaccio. Questa parte del processo normalmente ha luogo a temperature più alte di quelle della fase di congelamento: questo è dovuto al fatto che una maggiore temperatura consente di aumentare la tensione di vapore del ghiaccio, consentendo così di aumentare la velocità del processo. In questa fase si forma il "cake" che è la struttura solida che ha perso tutto il ghiaccio, ma che ancora ha residui di acqua che rimane attaccata alla struttura del prodotto e che non è congelata nella fase precedente (Fissore, et al., 2018).

La terza fase è l'**essiccamento secondario** che serve per estrarre l'acqua restante che non è congelata ed è legata chimicamente al cake: questa fase si realizza ad una temperatura maggiore di quella dell'essiccamento primario, favorendo il desorbimento dell'acqua nel cake.

Per capire questo processo serve vedere il diagramma di stato dell'acqua che si illustra in figura 1:

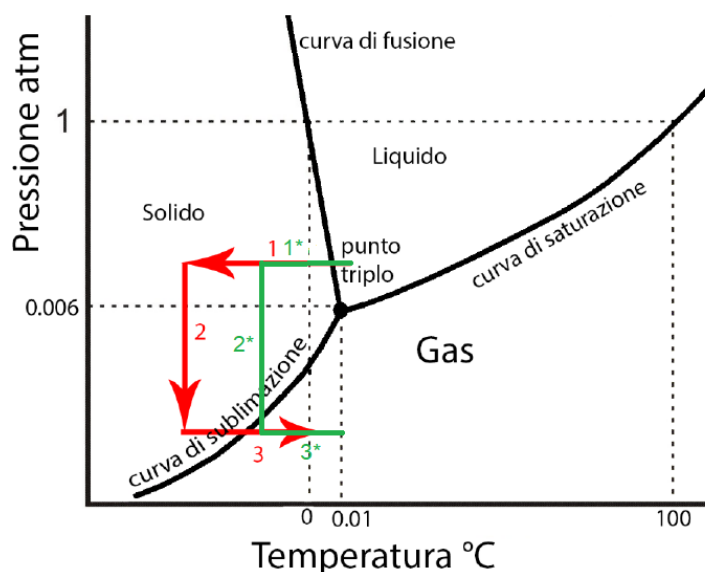


Figura 1 Diagramma di stato dell'acqua (immagine tratta Conti Dragà, 2019, modificata).

Nella figura si evidenziano tre frecce che descrivono il processo. La prima freccia corrisponde semplicemente alla fase di congelamento che si effettua ad una pressione maggiore del punto triplo, la seconda corrisponde all'abbassamento della pressione al di sotto del punto triplo, che consente la sublimazione del ghiaccio quando la temperatura del prodotto venga aumentata (freccia 3).

1.1.1 Fase di congelamento e nucleazione spontanea e controllata

Nel processo di congelamento accade inizialmente il fenomeno di nucleazione, che consiste nella formazione dei nuclei (aggregati di molecole), in questo caso di ghiaccio. Questi aggregati hanno una lunghezza caratteristica e una volta che arrivano a una certa grandezza e diventano stabili ha inizio la nucleazione, poi ha inizio la fase di accrescimento delle piccole particelle di ghiaccio con la formazione dei cristalli di ghiaccio veri e propri fino arrivare alla temperatura di congelamento, la cui dimensione sarà corrispondente dalla dimensione dei pori della struttura del prodotto essiccato nelle fasi seguenti. In figura 2 si può vedere un esempio dell'andamento della temperatura nel tempo in un flacone in cui una soluzione acquosa viene fatta congelare.

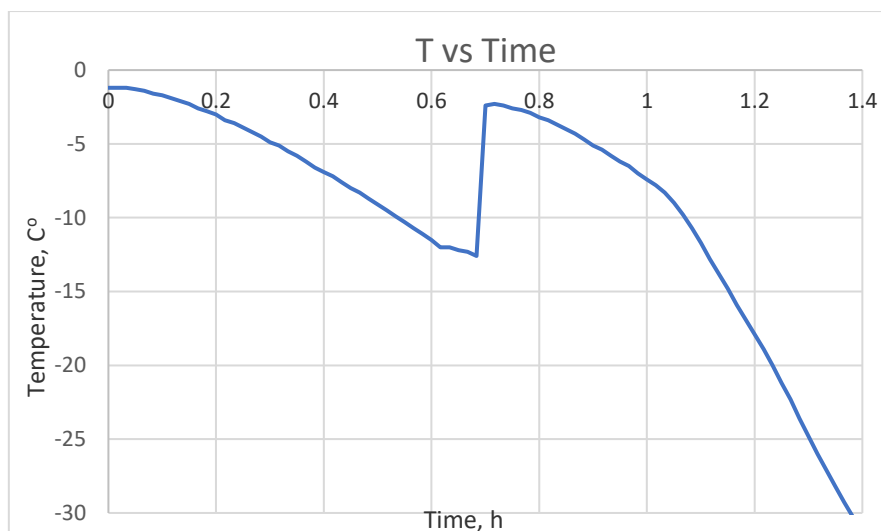


Figura 2 Andamento temperatura di un flacone contenente acqua e saccarosio 10% nella fase di congelamento spontaneo.

Nel grafico si capisce che per avviare il congelamento del prodotto si deve arrivare fino ad una temperatura al di sotto 0 °C (temperatura di nucleazione), dove ha inizio la formazione dei nuclei, e poi la temperatura comincia a salire poiché l'accrescimento delle particelle di ghiaccio si accompagna al rilascio di energia, fino a quando la temperatura di congelamento è raggiunta. I nuclei costituiscono il punto di partenza per la formazione dei cristalli di ghiaccio, la cui grandezza può variare in relazione alle condizioni nelle quali viene condotta la fase di congelamento (temperatura alla quale la nucleazione ha luogo, velocità di raffreddamento). La distribuzione delle dimensioni dei cristalli di ghiaccio va ad influenzare la struttura del cake e, quindi, la velocità con la quale esce il vapore durante la sublimazione e il desorbimento dell'acqua nelle seguenti fasi di essiccamento (Davide , et al., 2019). Questa è la ragione per la quale il congelamento è una fase molto importante per determinare la qualità del prodotto finale e per la ottimizzazione del processo.

Una volta completata la crescita della maggior parte dei cristalli di ghiaccio, la temperatura della soluzione inizia a decrescere per portarsi ad un valore in equilibrio con la temperatura del ripiano su cui i flaconi sono messi (in questa fase si completa poi la cristallizzazione dell'acqua non legata). Nella maggior parte dei casi, una temperatura finale di -50 °C può essere sufficiente per soddisfare i requisiti di congelamento (Aktiengesellschaft, 2020).

In genere si lavora in presenza di nucleazione spontanea, senza quindi andare ad intervenire sulla temperatura alla quale la nucleazione ha luogo e, pertanto, il grado di libertà disponibile è la rampa di raffreddamento: si è mostrato che più spinto sia il raffreddamento più piccoli saranno i cristalli di ghiaccio alla fine della congelamento, permettendo di avere un essiccamento secondario (desorbimento) più veloce dovuto all'aumento dell'area superficiale del prodotto, ma diminuendo lo spazio per il passaggio del vapore sublimato durante

l'essiccamento primario, quindi aumentando la sua durata (Patapoff & Overcashier, 2002). Inoltre, avere una sublimazione veloce ma poco spazio nel cake (pori piccoli) può scatenare il collasso del prodotto e danneggiare il principio attivo.

Un altro problema è che la nucleazione in tutti i flaconi non avviene alla stessa temperatura né agli stessi tempi, generando disuniformità nel batch di flaconi avendo dimensioni di cristalli e aree specifiche del prodotto essiccato diverse, a causa delle diverse storie termiche: tutto ciò influenzerà la temperatura e i tempi di essiccamento nei singoli flaconi. Nella figura 3 si può vedere la disomogeneità dei flaconi quando si realizza una nucleazione spontanea.

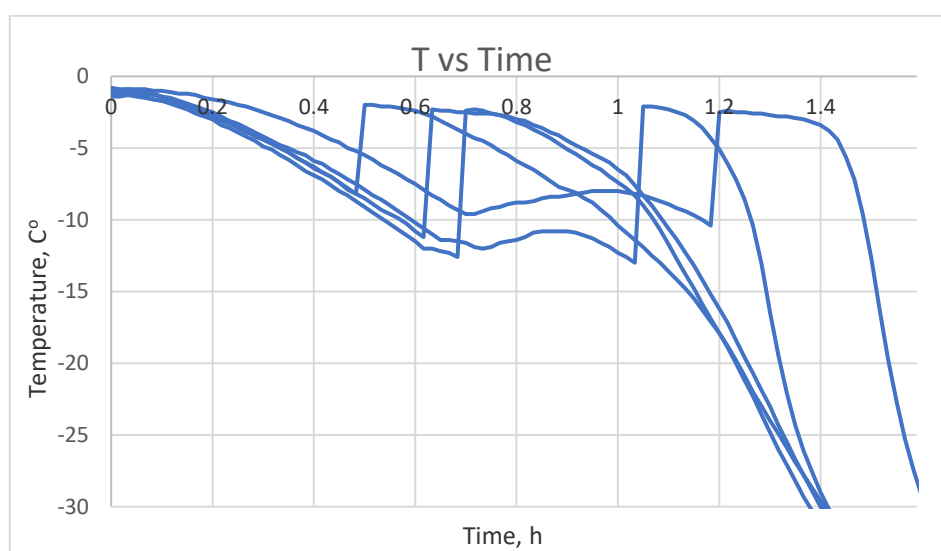


Figura 3 Andamento temperatura di 5 flaconi nello stesso batch contenenti acqua e saccarosio 10% nella fase di congelamento spontaneo.

Si osserva che un flacone può avere più di un'ora di differenza nell'inizio della nucleazione rispetto agli altri, ed anche la successiva storia termica può essere differente, determinando differenze anche significative nei risultati ottenuti alla fine del processo (in certi casi si può osservare il collasso del prodotto essiccato in alcuni campioni ed in altri no).

Adesso si può capire l'importanza della fase di congelamento nel processo di liofilizzazione, e il poter controllare la omogeneità del batch diventa di vitale necessità per ottimizzare il processo ed avere condizioni che non comprometteranno la qualità del prodotto finale e portino ad accelerare il processo, risparmiando energia.

Esistono altre strategie per congelare il prodotto ed avere maggior controllo sulla nucleazione dei cristalli di ghiaccio e, quindi, sulla struttura del cake, come la nucleazione controllata che permette avere omogeneità in tutto il batch. Di solito si usano due metodologie per fare la nucleazione controllata.

La prima è la nebbia di ghiaccio (*ice fog*) e consiste nella creazione di micro particelle di ghiaccio che costituiscono una nebbia che è introdotta dove ci sono i flaconi col prodotto: la temperatura delle microparticelle deve essere molto simile a quella del prodotto, e nel momento in cui la nebbia entra in contatto con la soluzione essa porta i nuclei a tutti i flaconi, avviando in questa maniera la nucleazione in tutti i flaconi allo stesso istante. Normalmente la nebbia viene generata e mantenuta stabile grazie al condensatore, e poi viene alimentata alla camera di liofilizzazione nell'istante in cui è necessario avviare la nucleazione. Nella figura 4 si può vedere le fasi del processo di nucleazione controllata con *ice fog*.



Figura 4 Fasi della nucleazione controllata col *ice fog* (immagine tratta da I.M.A. Industria Macchine Automatiche S.P.A., 2016, modificata).

Per produrre la nebbia di ghiaccio c'è più di una maniera, non solo quella realizzata coll'uso del condensatore, ma c'è una tecnica che si chiama VERISEQ®. Per capire questa tecnica serve guardare la figura 5.

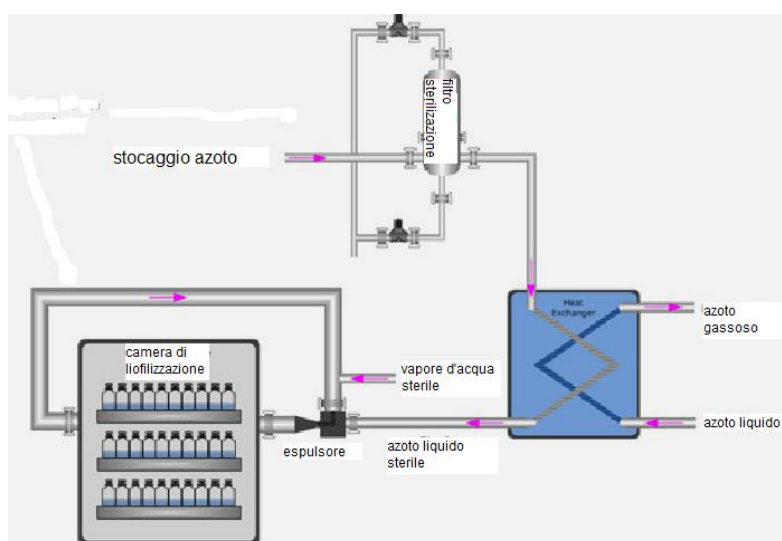


Figura 5 Diagramma di processo del metodo VERISEQ® (immagine tratta da I.M.A. Industria Macchine Automatiche S.P.A., 2016, modificata).

Nel caso del metodo VERISEQ® è necessario iniettare azoto liquido insieme a vapore d'acqua che viene a essere congelato una volta si è mischiato coll'azoto, generando la nebbia di ghiaccio. In figura anche si vedono i pretrattamenti dell'azoto, che viene filtrato e fatto raffreddare prima di entrare a contatto col vapore d'acqua. L'azoto non influenza il nostro processo essendo sterile e potendo uscire poi con la pompa di vuoto. La tecnica è stata sviluppata da IMA LIFE in collaborazione con Linde (I.M.A. Industria Macchine Automatiche S.P.A., 2016).

La seconda tecnica più utilizzata è la depressurizzazione, anche conosciuta nella industria come ControLyo® (Bosch, 2019), e consiste nella pressurizzazione della camera di liofilizzazione al di sopra la pressione atmosferica, che verrà fatta andare sottovuoto al momento in cui si vuole far avvenire la nucleazione per far evaporare le prime molecole di acqua nei flaconi: per evaporare le molecole hanno bisogno di energia per superare la energia di vaporizzazione (ΔH_v) (Çengel , 2011), in questa maniera l'abbassamento di temperatura conseguente al raffreddamento determina la formazione dei primi nuclei. In figura 6 e 7 si può vedere la differenza della grandezza dei cristalli di ghiaccio in una nucleazione spontanea ed una nucleazione controllata con ControLyo®.

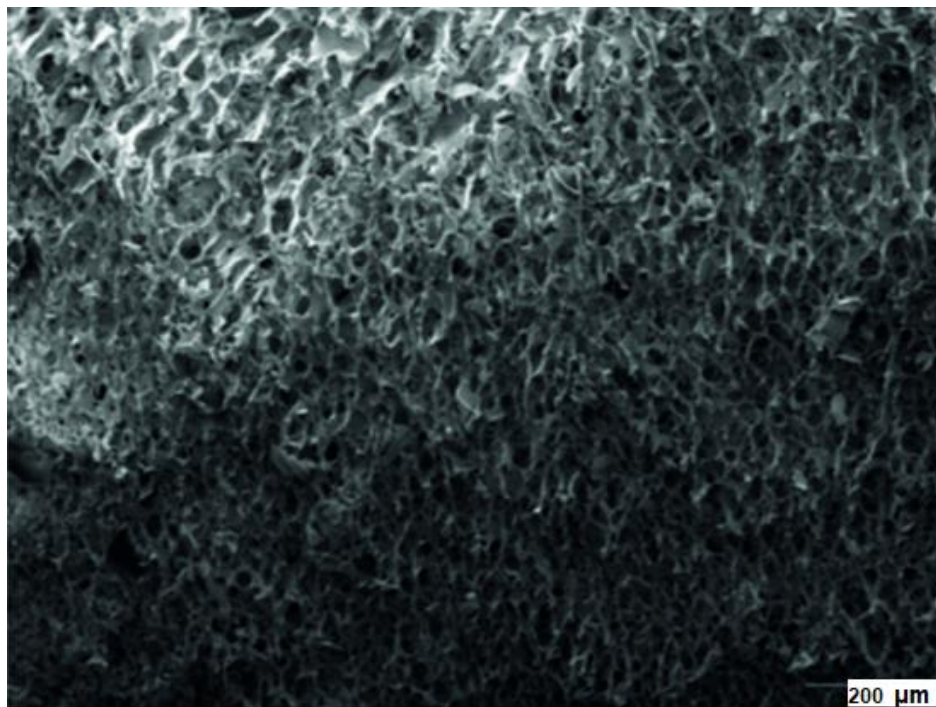


Figura 6 Struttura dei pori del cake vista col SEM per 7.5 mg di saccarosio usando nucleazione spontanea (immagine tratta da Bosch, 2019, modificata).

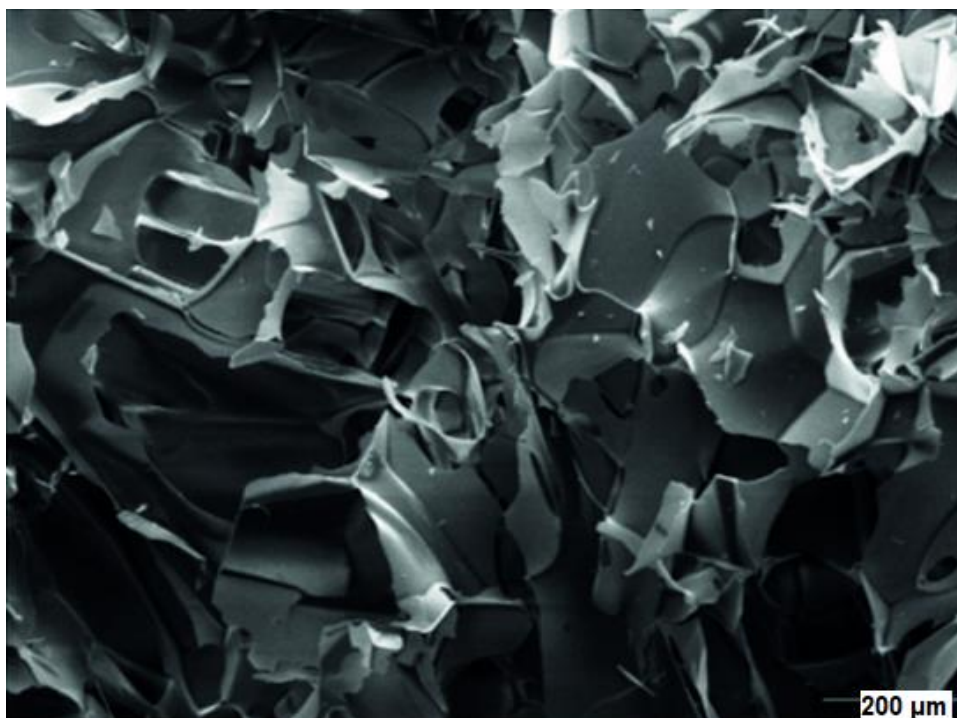


Figura 7 Struttura dei pori del cake vista col SEM per 7.5 mg di saccarosio usando nucleazione controllata con ControlLyo® a -3 °C (immagine tratta da Bosch, 2019, modificata).

Dalle figure si osserva che innescando la nucleazione a -3 °C si ha la formazione di cristalli grandi, mentre nel caso di nucleazione spontanea, che normalmente avviene a temperature più basse, si ha la formazione di cristalli di ghiaccio molto più piccoli: questo si traduce in un essiccamento primario più lento (Patapoff & Overcashier, 2002).

In figura 8 si mostra la temperatura dei flaconi monitorati durante la fase di congelamento usando la tecnica di nucleazione controllata con la nebbia di ghiaccio (*ice fog*) a -7 °C.

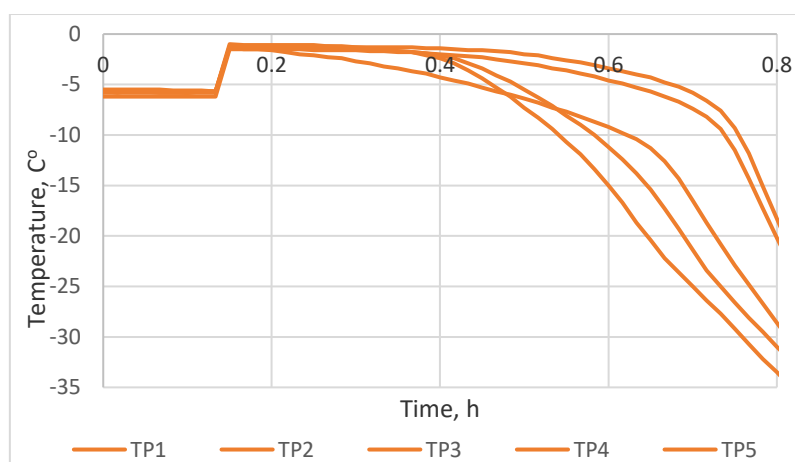


Figura 8 Temperatura dei flaconi monitorati durante la fase di congelamento usando la nucleazione controllata con ice fog a -7 °C.

Si osserva in figura che in tutti i flaconi ha luogo la nucleazione quasi allo stesso istante e con temperature molto vicine, quindi storie termiche simili.

1.1.2 Fasi d'essiccamento primario e secondario

Una volta che l'acqua del nostro prodotto si trova nella totalità congelata, comincia la fase di essiccamento primario o *primary drying*: la fase consiste nell'abbassare la pressione ad un punto dove la sublimazione del ghiaccio abbia inizio. La sublimazione è un fenomeno endotermico, cioè richiede calore per avere luogo (Çengel , 2011). La temperatura durante l'essiccamento primario normalmente può essere molto maggiore rispetto a quella durante la fase di congelamento, ma sempre al di sotto il punto triplo come si è fatto vedere nella figura 1.

L'essiccazione primaria (sublimazione) è un processo lento, condotto a temperature comunque basse, in modo sicuro al di sotto della temperatura critica di collasso del prodotto (Barley, 2019), quindi, si deve essere molto attenti alla temperatura del prodotto. In figura 9 si mostrano le diverse fonti di calore che riscaldano il prodotto.

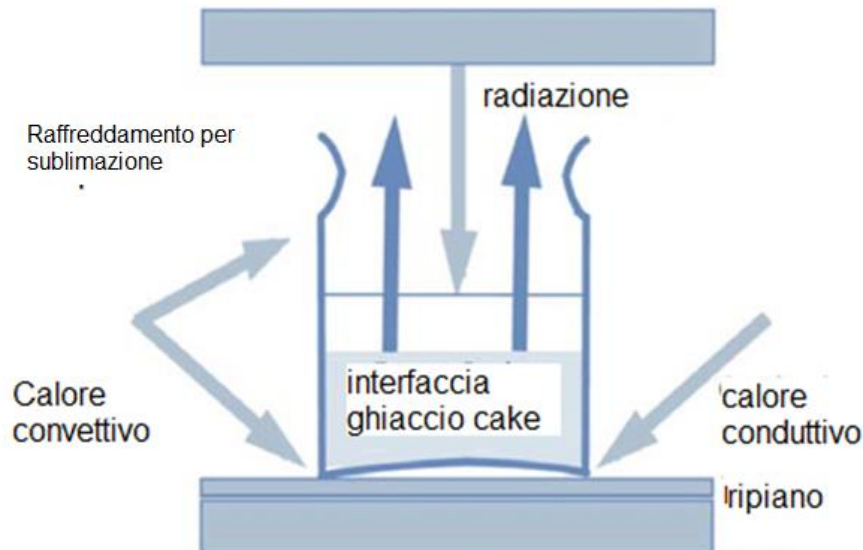


Figura 9 Trasferimento di calore in un flacone durante l'essiccamento primario (immagine tratta da Barley, 2019, modificata).

Tutti e tre i metodi di trasferimento del calore, ovvero conduzione, convezione e irraggiamento, devono essere considerati durante la liofilizzazione di un prodotto. In un liofilizzatore con ripiani la maggior parte del calore viene trasferito nel prodotto per conduzione e convezione ed è importante massimizzare il contatto superficiale del flacone col ripiano

(Barley, 2019). Difatti, in condizioni di bassa pressione il calore trasferito per conduzione viene minimizzato, essendo la concentrazione di molecole del gas molto piccola, andando quindi a rallentare lo scambio di calore (Incropera, 1999).

Il calore radiante dalle pareti interne della camera del liofilizzatore farà sì che i flaconi sul perimetro del ripiano si asciugano più rapidamente del prodotto al centro del ripiano (noto in liofilizzazione come "effetto bordo"). Per questo motivo, i liofilizzatori di produzione sono progettati con porte in metallo. Un foglio di alluminio può essere appeso davanti al prodotto all'interno di un liofilizzatore come "scudo": ovviamente questo bloccherà la vista del prodotto e non consentirà l'osservazione durante il processo (Barley, 2019). Nei liofilizzatori pilota si usano anche degli anelli raffreddanti che sono a contatto con i flaconi nei bordi, bilanciando l'effetto dell'irraggiamento: questo è fatto per simulare *batch* di flaconi in posizione centrale, i più lenti a completare l'essiccamento.

L'essiccazione primaria è un processo che ha luogo in un flacone dall'alto verso il basso, con un fronte di sublimazione ben definito che si muove attraverso il prodotto mentre esso si asciuga. Sopra l'interfaccia della superficie del ghiaccio si trova il prodotto essiccato, sotto l'interfaccia c'è un prodotto con cristalli di ghiaccio ancora da sublimare. Alla fine dell'essiccazione primaria, quando tutti i cristalli di ghiaccio sono sublimati, il prodotto apparirà essiccato. Tuttavia, il contenuto di umidità può essere ancora compreso tra il 5 e il 10% a causa della presenza di molecole d'acqua "adsorbite" al prodotto (SP Scientific, 2020).

A questo punto c'è bisogno di innalzare la temperatura ancora di più per eliminare l'acqua residua: questa fase ha il nome di essiccamento secondario. Il processo normalmente si realizza alle stesse condizioni di pressione dell'essiccamento primario, per questa ragione diventa importante poter definire la pressione di lavoro durante l'essiccamento primario.

L'utilizzo della Tabella di pressione di vapore del ghiaccio è un modo per determinare una pressione appropriata per la liofilizzazione. Una linea guida generale consiste nello scegliere una pressione del sistema compresa tra il 20% e il 30% della pressione di vapore del ghiaccio alla temperatura obiettivo del prodotto. Tipicamente, i livelli di vuoto per la liofilizzazione sono compresi tra 50 mTorr e 300 mTorr con 100 mTorr - 200 mTorr intervallo più comune (Barley, 2019). In figura 10 si vede la tabella di pressione di vapore del ghiaccio ad alcune temperature di ghiaccio.

VAPOR PRESSURE OVER ICE CHART					
Temp			Temp		
Deg C	mTorr	mBar	Deg C	mTorr	mBar
0	4,584.00	6.111480	-50	29.500	0.039330
-2	3,883.00	5.176893	-52	23.000	0.030664
-4	3,281.00	4.374295	-54	17.900	0.023865
-6	2,765.00	3.686353	-56	13.800	0.018398
-8	2,325.00	3.099737	-58	10.600	0.014132
-10	1,949.00	2.598446	-60	8.100	0.010799
-12	1,630.00	2.173149	-62	6.160	0.008213
-14	1,359.00	1.811846	-64	4.660	0.006213
-16	1,130.00	1.506539	-66	3.510	0.004680
-18	936.80	1.248960	-68	2.630	0.003506
-20	774.40	1.032446	-70	1.960	0.002613
-22	638.20	0.850861	-72	1.450	0.001933
-24	524.30	0.699007	-74	1.060	0.001413
-26	429.40	0.572485	-76	0.780	0.001040
-28	350.50	0.467294	-78	0.570	0.000760
-30	285.10	0.380101	-80	0.410	0.000547
-32	231.20	0.308240	-82	0.290	0.000387
-34	186.80	0.249045	-84	0.210	0.000280
-36	150.30	0.200383	-86	0.150	0.000200
-38	120.60	0.160786	-88	0.100	0.000133
-40	96.30	0.128389	-90	0.072	0.000096
-42	76.70	0.102258	-92	0.049	0.000065
-44	60.80	0.081060	-94	0.034	0.000045
-46	48.00	0.063995	-96	0.023	0.000031
-48	37.70	0.050262	-98	0.015	0.000020

Figura 10 tabella di pressione di vapore del ghiaccio (immagine tratta da SP Scientific , 2020, modificata).

Poiché la maggior parte dei liofilizzatori commerciali non sono in grado di controllare in modo accurato il grado di vuoto al di sotto di 30 mTorr, a temperature del prodotto molto basse (inferiori a -40 ° C) diventa impossibile raggiungere una pressione del sistema tra il 20% e il 30% della pressione del vapore del ghiaccio (SP Scientific, 2020).

1.2 Tecnologie analitiche di processo (PAT)

Durante il processo di liofilizzazione è necessario poter monitorare le variabili di processo, così potendo determinare, ad esempio, quando finiscono le fasi del processo. Le tecnologie analitiche di processo (PAT) possono essere utilizzate a tale scopo. Ci sono disponibili diversi

metodi per determinare se l'essiccazione primaria è stata completata. Il metodo più semplice è monitorare la temperatura del prodotto con una termocoppia. La temperatura del prodotto misurata sarà minore della temperatura del ripiano durante l'essiccazione primaria, e questo è dovuto al fatto che il calore dal ripiano viene utilizzato per il cambio di fase. Quando la sublimazione dei cristalli di ghiaccio è completa, la temperatura del prodotto aumenterà e si avvicinerà alla temperatura del ripiano. Una volta che la temperatura del prodotto è uguale alla temperatura del ripiano, si può dedurre che l'essiccazione primaria è completa (Barley, 2019).

Purtroppo, i flaconi che contengono la termocoppia si asciugheranno in genere più velocemente degli altri flaconi sul ripiano perché il sensore va ad influenzare la fase di nucleazione (Fissore, 2017). È importante quindi consentire una modesta quantità di tempo di asciugatura aggiuntivo (da 30 min a 2 ore, a seconda delle caratteristiche del prodotto) dopo che la temperatura della termocoppia del prodotto è aumentata per garantire che tutto il ghiaccio nell'intero lotto di prodotto sia stato completamente sublimato (Barley, 2019).

In figura 11 si vedono alcune termocoppie utilizzate per la misura della temperatura del prodotto.



Figura 11 Esempi di termocoppie entro i flaconi (immagine tratta da SP Scientific , 2020 e riprodotta con modifiche).

Poiché il prodotto si asciuga dall'alto verso il basso, la punta della termocoppia deve essere sempre posizionata nella parte inferiore e centrale del contenitore. Va bene se la termocoppia tocca il fondo del contenitore, perché se non tocca il fondo si può registrare un innalzamento nella temperatura del flacone dovuta al fatto che non c'è contatto fra la parte congelata e la

punta della termocoppia e non al fatto che il processo è concluso (Fissore, 2017). In caso di essiccazione in flaconi, è buona norma inserire la termocoppia in un flacone posto al centro del ripiano. Gli effetti del riscaldamento radiante faranno infatti asciugare più rapidamente prodotto sul perimetro del ripiano (Barley, 2019).

Ulteriori strumenti per la determinazione della fine della essiccazione primaria sono disponibili su alcuni liofilizzatori dotati di sistemi avanzati di monitoraggio e di controllo del processo. Uno di questi metodi comporta il confronto di letture di pressione tra un manometro Pirani e un manometro capacitivo. Un manometro capacitivo fornisce sempre una lettura reale della pressione nella camera del prodotto. L'indicatore Pirani, invece, darà una lettura di pressione influenzata dalla presenza di vapore acqueo. Quando il valore misurato dal sensore Pirani si avvicina al valore rilevato dal sensore capacitivo vuol dire che è assente vapore acqueo dalla camera di liofilizzazione e si può concludere che l'essiccazione primaria è stata completata (Barley, 2019).

Un altro strumento è disponibile con i modelli di liofilizzatori dotati di condensatori esterni. È possibile aggiungere una valvola di isolamento nel condotto che collega la camera di liofilizzazione al condensatore. Questa valvola può essere chiusa per un breve periodo di tempo e può essere misurato il successivo aumento di pressione nella camera del prodotto. Quando questo aumento di pressione si avvicina allo zero, non viene più generato vapore acqueo tramite sublimazione (SP Scientific, 2020).

1.3 Parametri K_v e R_p

Ci sono diversi modelli matematici per descrivere il processo di liofilizzazione, ma il problema è che trovare la soluzione di questi è complesso e difficile, per questo motivo sono stati proposti modelli semplici, che coinvolgono i parametri K_v e R_p , ovvero il coefficiente di scambio termico dal ripiano del liofilizzatore al prodotto nel flacone, e la resistenza del prodotto essiccato al flusso di vapore dall'interfaccia di sublimazione alla camera del liofilizzatore.

Attraverso questi parametri si può calcolare il flusso dall'interfaccia di sublimazione alla camera di liofilizzazione, che a sua volta è legato al gradiente di pressione parziale di acqua tra l'interfaccia e la camera, e il flusso termico scambiato con il prodotto, anche legato al gradiente di temperatura fra il fluido riscaldante e il prodotto.

Il parametro K_v è il coefficiente di scambio termico fra il prodotto e lo *shelf* e viene descritto come la somma di vari contributi (Pisano, et al., 2011), come si vede nella equazione (1):

$$K_v = K_c + K_r + K_g \quad (1)$$

In questa equazione il parametro K_c descrive il meccanismo di trasferimento di calore per conduzione fra lo *shelf* e il flacone nei punti di contatto, il secondo parametro K_r considera il trasferimento di calore per irraggiamento proveniente delle pareti all'interno della camera, e il terzo parametro K_g descrive il trasferimento di calore attraverso il gas presente nel sistema (Incropera, 1999).

Il flusso di calore è proporzionale alla differenza tra la temperatura dello *shelf* e la temperatura nella parte inferiore dei falconi, assumendo che la temperatura del prodotto sia uniforme nella direzione radiale. In questa maniera il coefficiente di trasferimento di calore K_v viene utilizzato per correlare il flusso di calore dalla forza motrice, che corrisponde alla differenza di temperatura (Pisano, et al., 2011):

$$J_q = K_v(T_{shelf} - T_B) \quad (2)$$

Il coefficiente R_p è legato allo spessore seco del cake (L_{dried}) mediante i parametri A_{Rp} e B_{Rp} , ricavati sperimentalmente (Giordano, et al., 2011):

$$R_p = R_{p,0} + \frac{A_{Rp} \cdot L_{dried}}{1 + B_{Rp} \cdot L_{dried}} \quad (3)$$

1.4 Considerazioni dello scale-up del processo

I liofilizzatori da laboratorio vengono spesso utilizzati per sviluppare un ciclo da utilizzare in unità di dimensioni più grandi. Si deve quindi garantire che un processo di liofilizzazione sviluppato in laboratorio possa essere trasferito con successo a un liofilizzatore di produzione assicurando analoghi meccanismi di scambio termico.

Uno dei fattori più importanti da considerare è poi la differenza tra l'ambiente di un liofilizzatore di produzione, privo di impurezze, e l'ambiente di laboratorio in cui opera la maggior parte delle unità pilota, dal momento che la presenza di polvere può influenzare

notevolmente il congelamento del prodotto e le dimensioni dei cristalli di ghiaccio ottenuti (Barley, 2019).

I liofilizzatori di produzione sono generalmente configurati per il funzionamento in un ambiente sterile e possono avere la capacità di fare *clean-in-place* (CIP) e sterilizzazione a vapore (SIP) (SP Scientific, 2020).

1.5 Micro-FD e Mini-FD

I liofilizzatori di piccola dimensione sono molto utili poiché evitano lo spreco di materiale che nell'area farmaceutica costa tanto, ma presentano il problema di riprodurre le condizioni di un liofilizzatore su scala industriale. Ci sono due apparecchiature pilota proposte: una è il Micro-FD e il Mini-FD.

Il mini-liofilizzatore (Mini-FD) progettato dalla Sp Scientific dispone di un'area dello *shelf* ridotta che permette alloggiare 7 fiale 20R (20 cm³): solo uno dei flaconi è in centro, quindi gli altri 6 sono flaconi di bordo. L'apparecchiatura è quindi utile per simulare la liofilizzazione in flaconi ai bordi di una apparecchiatura industriale: questi ricevono più calore per irraggiamento delle pareti e quindi hanno un tempo di essiccamento minore rispetto ai flaconi centrali. Il Mini-FD è in grado di imitare il profilo di temperatura ottenuto nei liofilizzatori su scala di produzione: questo è dovuto al fatto che l'apparecchiatura dispone di 4 pareti interne a temperatura controllata e uno *shelf* inferiore e superiore anche controllati, ed è in questa maniera che si risolve il problema di avere tanti flaconi di bordo, consentendo il controllo del profilo di temperatura di ottenere risultati simili a quelli che si troverebbero in apparecchiature industriali. Il liofilizzatore ha anche un misuratore di pressione Pirani, un manometro capacitivo e un misuratore di flusso di vapore TDLAS, dispositivi che permettono la misura della resistenza al flusso di vapore (R_p), variabile molto influenzata dallo scale-up del processo, dovuto a che si presenta una variazione della temperatura di nucleazione del ghiaccio quando si lavora con batch più grandi. Altri studi hanno dimostrato che modificando la temperatura delle pareti i coefficienti di trasferimento del calore e i suoi profili di temperatura nel Mini-FD sono approssimabili a quelli ottenuti in apparecchiature che hanno una maggior capacità (*LyoStar II*) (Obeidat, et al., 2018).

L'altro liofilizzatore pilota proposto è stato il Micro-FD sviluppato dalla Millrock Technology, che è l'apparecchiatura utilizzata per gli esperimenti in questa Tesi. Il Micro-FD risolve il problema dell'irraggiamento quando si ha un batch con pochi flaconi (problema dei flaconi di bordo) fornendo anche un controllo ottimale delle fasi di essiccamento e congelamento potendo ottenere prove con la stessa storia termica come se fossero fatti in un liofilizzatore industriale. Il liofilizzatore ha la capacità di operare in due configurazioni diverse, 7 flaconi

20R (20 cm³) o 19 flaconi 6R (6 cm³); inoltre, l'apparecchiatura dispone di un anello di alluminio che consente un controllo di temperatura sui flaconi di bordo ottimo, essendo indipendente dalla temperatura dello *shelf*. Questo anello (*LyoSim*) permette di simulare di avere flaconi centrali oppure di bordo, potendo ottenere i coefficienti di trasferimento di calore (K_v) che si vuole in tutto il batch.

Nell'apparecchiatura c'è un sensore di flusso di calore (*Accuflux*) che si trova direttamente sulla superficie dello *shelf*: questo sensore permette il monitoraggio del flusso di calore durante tutte le fasi del processo (congelamento, essiccamento primario e secondario), potendo in questa maniera determinare i parametri critici del processo come sono il coefficiente di trasferimento di calore (K_v) e consente la possibilità di capire l'effetto sul coefficiente di trasferimento di calore dei livelli di vuoto e della temperatura dello *shelf* (Thompson, et al., 2017).

1.6 Obiettivi della Tesi

Lo studio sviluppato in questa Tesi è stato condotto utilizzando il liofilizzatore Micro-FD. L'interesse in questa apparecchiatura deriva dal fatto che permette di controllare la fase di congelamento, potendo usare una metodologia di nucleazione controllata (*ice fog*) e cambiare la velocità di raffreddamento in un ampio range di valori.

La prima parte della tesi è focalizzata a studiare l'influenza della velocità di raffreddamento sull'essiccamento primario mantenendo la nucleazione del prodotto spontanea, solo cambiando la concentrazione della soluzione, poi si cerca di capire l'effetto dell'aggiunta di una sosta di stabilizzazione durante la fase di congelamento.

Nella seconda parte dello studio si è cercato di ripetere le prove alle stesse condizioni usando la nucleazione controllata: prima si è voluto capire gli effetti delle diverse temperature di nucleazione sull'essiccamento primario, poi lo studio si è focalizzato di nuovo sul cambio delle velocità di raffreddamento, a nucleazione avvenuta. Per ciascuna delle prove sono stati verificati i profili di temperatura dei flaconi monitorati, il profilo di pressione in camera e la resistenza al trasporto di vapore del cake R_p . Tutto questo coll'obiettivo di capire le differenze nei risultati con le diverse condizioni operative.

2. Metodologia e Materiali

In questa parte dello studio verranno presentate le apparecchiature, i materiali e la metodologia utilizzata per la conduzione delle prove sperimentali che guideranno ai risultati finale del lavoro di Tesi. Saranno descritte le condizioni operative, la preparazione degli esperimenti e gli strumenti utilizzati per le misurazioni in ogni prova sperimentale, nonché le caratteristiche principali del liofilizzatore utilizzato Micro-FD, i suoi componenti e il suo sistema di controllo LyoPat.

2.1 Materiali utilizzati

Gli esperimenti sono stati svolti con una soluzione di saccarosio alla concentrazione di 5% o 10% in peso. Si è impiegato saccarosio prodotto da Sigma-Aldrich con una purezza superiore al 99.5%: si è deciso di usare saccarosio essendo esso uno dei più utilizzati *bulking agents*, con l'obiettivo di rendere stabile la struttura del prodotto essiccato anche quando si hanno concentrazioni della soluzione molto basse, come succede normalmente nella produzione di prodotti farmaceutici.

Per gli esperimenti condotti nel Micro-FD saranno utilizzati flaconi di tipo 6R *tubing*: questi flaconi hanno dimensioni come si vedono nella figura 12. I test realizzati nel Micro-FD sono stati fatti con 19 flaconi 6R, da cui 7 sono falconi interni e 12 flaconi di bordo. Le caratteristiche e dimensioni si vedono in seguito.

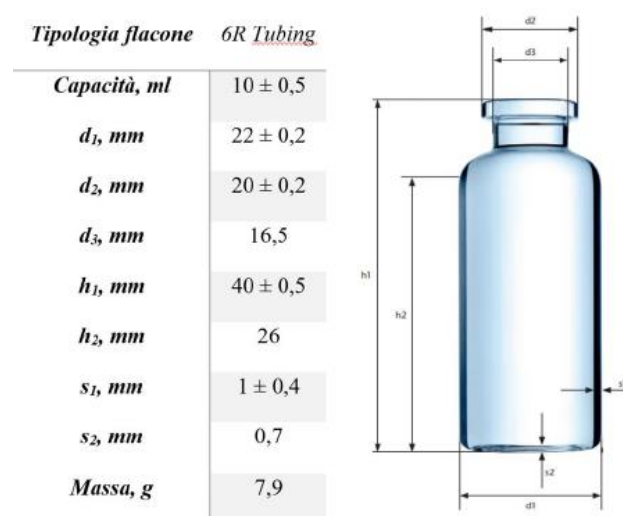


Figura 12 Dimensioni e caratteristiche dei flaconi 6R

I flaconi che sono stati utilizzati durante il processo di liofilizzazione erano parzialmente chiusi con un tappo di plastica, questo con l'obiettivo di avere aperture laterali che permettevano la fuoriuscita del solvente sublimato durante la fase di essiccamento primario. In figura 13 si vede il tappo utilizzato e il flacone 6R.



Figura 13 Flacone e tappo 6R

2.2 Apparecchiatura e componenti utilizzati

In questa sezione si presentano le caratteristiche dell'apparecchiatura dove sono stati realizzati gli esperimenti e i suoi componenti.

2.2.1 Micro-FD

Il Micro-FD è una apparecchiatura pilota piccola, che consente di ottenere risultati simili a quelli ottenibili in liofilizzatori industriali. Il liofilizzatore ha le seguenti dimensioni 30"x 20"x 67" e peso circa 236 Kg, quindi si capisce che un liofilizzatore che può essere messo in qualsiasi posto con poca difficoltà. In figura 14 è mostrata l'apparecchiatura dall'esterno.



Figura 14 Apparecchiatura Micro-FD, parte esterna

Nella parte alta, di fianco al computer, c'è un coperchio che, una volta aperto, permette osservare la camera di liofilizzazione. In Figura 15 si vede la camera e i suoi componenti.

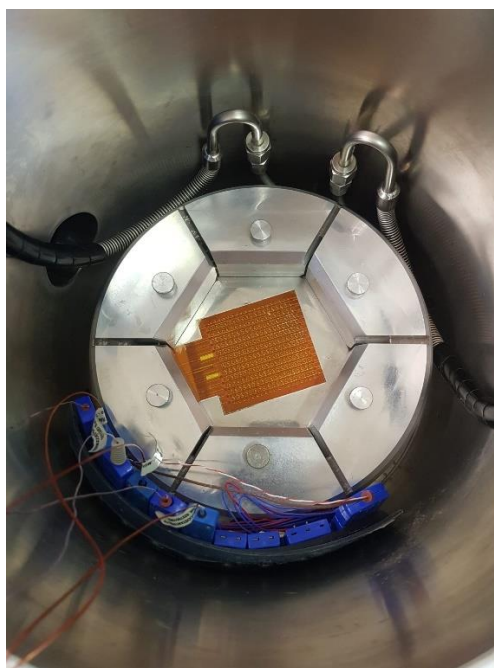


Figura 15 Camera di liofilizzazione del Micro-FD

La camera di liofilizzazione ha una forma cilindrica, i componenti che si trovano in quello spazio sono: l'anello *LyoSim*, il sensore *Accuflux*, lo *shelf* riscaldante e le termocoppie insieme alle installazioni elettriche necessarie per il processo. La camera viene chiusa da un coperchio con delle guarnizioni in silicone impedendo l'entrata dell'aria e si assicura la sua chiusura col vuoto; è da evidenziare che il coperchio ha la possibilità d'avere un controllo di temperatura indipendente, permettendo di simulare la presenza di uno *shelf* superiore, come quello che si avrebbe in un liofilizzatore di scala industriale.

Il sensore *Accuflux* è un sensore di flusso calore, disposto sul ripiano riscaldante, direttamente in contatto coi flaconi. In figura 16 si vede il sensore *Accuflux* più in dettaglio.

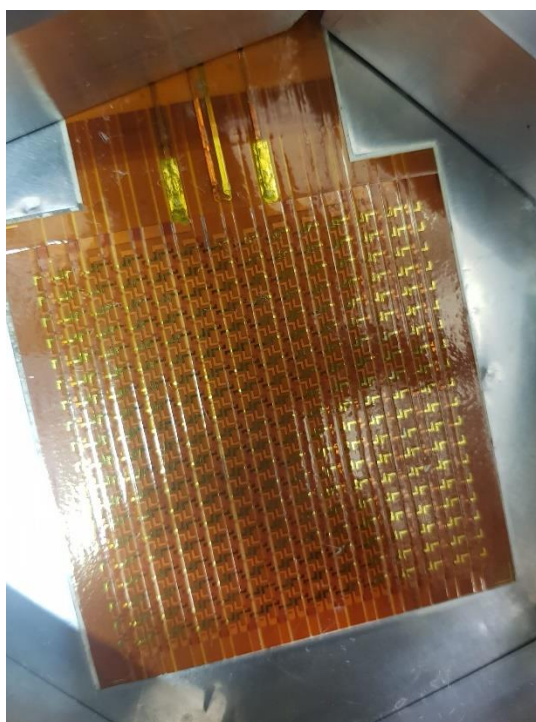


Figura 16 Sensore di flusso di calore *Accuflux*

In questo sistema lo *shelf* ha in carico il congelamento del prodotto dentro la camera, ed anche è quello che apporta calore per le fasi d'essiccamento del processo. Il sistema funziona facendo circolare un fluido termico che offre la capacità di realizzare un processo di liofilizzazione, il fluido termico che utilizza si chiama *Slytherm* ed è un polimero molto resistente e stabile alle condizioni del processo, offrendo un range di operazione fra -60 °C e 60 °C, ed anche ha la caratteristica di essere un fluido poco viscoso. Questo ripiano riscaldante si trova nella parte inferiore della camera, ha forma circolare con un diametro di 6".

Un'altra cosa interessante del Micro-FD è che può variare la sua capacità cambiando il tipo di flacone e l'anello *LyoSim* utilizzato, premettendo di avere 3 diverse configurazioni,

rispettivamente con 7, 19 o 37 flaconi, configurazioni che assicurano che tutti i flaconi siano in contatto coll'anello. Il *LyoSim* è composto da sei blocchi d'acciaio, uniti a formare un anello, in cui circola lo stesso fluido *Slytherm* del ripiano, ma la temperatura dell'anello è indipendente da quella nello *shelf*, inoltre ha un intervallo operativo da -60 °C a 60 °C e permette di seguire la temperatura dello *shelf*. L'operatore ha la possibilità di impostare il *LyoSim* in maniera manuale a seguire un valore determinato, sia una temperatura media, quella di una delle termocoppie o quella dello *shelf* e farlo andare -15 °C o +15 °C rispetto al valore che si segue, così potendo garantire le condizioni operative desiderate. Nella seguente figura si vede l'anello *LyoSim* con la disposizione delle termocoppie nei flaconi.

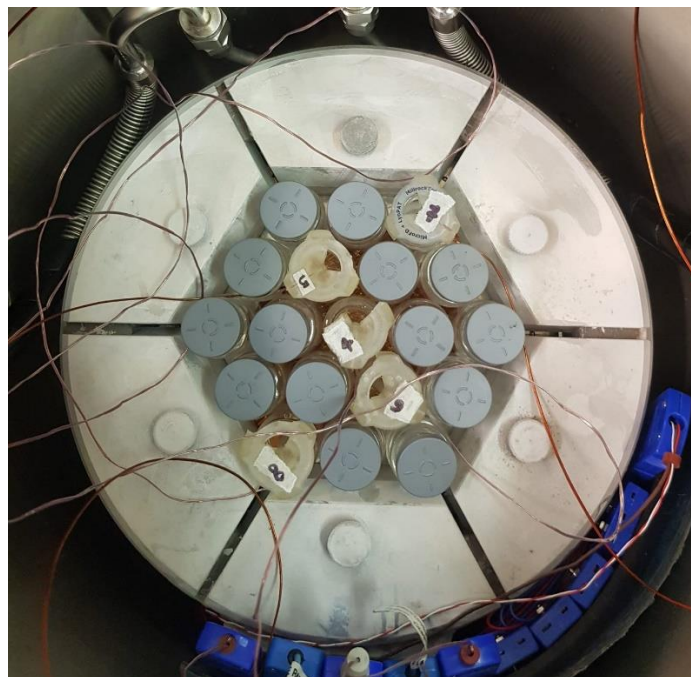


Figura 17 Anello *LyoSim* e disposizione delle termocoppie

Si decide di adottare una configurazione dove ci siano 2 termocoppie a monitorare flaconi di bordo, 2 a monitorare flaconi semicentrali e 1 sola a monitorare un flacone in posizione centrale.

Inoltre, ci sono altri due componenti molto importanti nel liofilizzatore Micro-FD che sono il condensatore e la pompa da vuoto: il primo ha la funzione di prendere il vapore d'acqua che esce del prodotto dovuto alla sublimazione per poi condensarlo completamente, evitando accumulo di vapore che può alzare la pressione. Questo condensatore è costituito da una serpentina dove passa il fluido raffreddante che consente di arrivare a temperature di -70 °C, potendo condensare a una velocità di 0,5 litri al giorno, se non c'è eccessiva formazione di ghiaccio sul condensatore. Inoltre, il condensatore è isolato dalla camera di liofilizzazione tramite una valvola pneumatica a farfalla.

La pompa da vuoto offre la possibilità di raggiungere pressioni molto basse rispetto a quella atmosferica: nel caso degli esperimenti che sono stati realizzati la pressione si è mantenuta sempre a 60 mTorr, dove si ha normalmente la sublimazione del ghiaccio a circa -44 °C come si è potuto vedere nella figura 10 del capitolo precedente. Comunque, l'apparecchiatura ha la capacità di arrivare fino a 10 mTorr, cosa che permetterebbe realizzare processi di liofilizzazione in condizioni più critiche. In figura 18 si vede il condensatore del Micro-FD con ghiaccio al suo interno dopo aver finito un ciclo intero di liofilizzazione.



Figura 18 Condensatore del Micro-FD dopo un ciclo completo di liofilizzazione

Il monitoraggio della pressione della camera di liofilizzazione viene effettuato tramite 2 manometri. Il primo è il manometro Pirani che funziona con un meccanismo basato sulla termoconducibilità: questo misura pressioni tra 0 e 760.000 mTorr, il secondo è il manometro capacitivo Baratron che misura pressioni fra 0 e 2000 mTorr, cioè solo fornisce valori di pressione quando il vuoto è molto spinto.

Dal rapporto fra i due valori di pressione misurati coi due manometri si può definire la fine dell'essiccamento primario. Quando il sensore Pirani rileva una pressione uguale a quella misurata dal sensore di pressione capacitivo la sublimazione del ghiaccio è sicuramente completa (Fissore, et al., 2018). In figura 19 si può vedere quello che sarebbe un andamento normale di tale rapporto durante l'essiccamento primario.

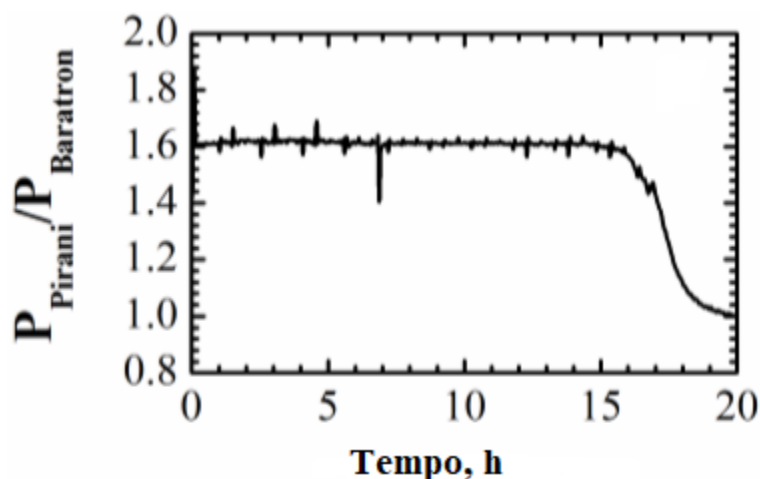


Figura 19 Andamento pressione Pirani/Baratron durante essiccamento primario (immagine tratta da Fissore, Pisano, & Barresi, 2018, modificata)

2.2.2 LyoPat®

LyoPat è una interfaccia software semplice e molto intuitiva dell'apparecchiatura utilizzata, che serve per l'analisi dei dati del liofilizzatore e consente all'operatore di gestire, controllare ed ottimizzare tutte le fasi del processo di liofilizzazione. In figura 20 si vedono i componenti principali della interfaccia *LyoPat*.

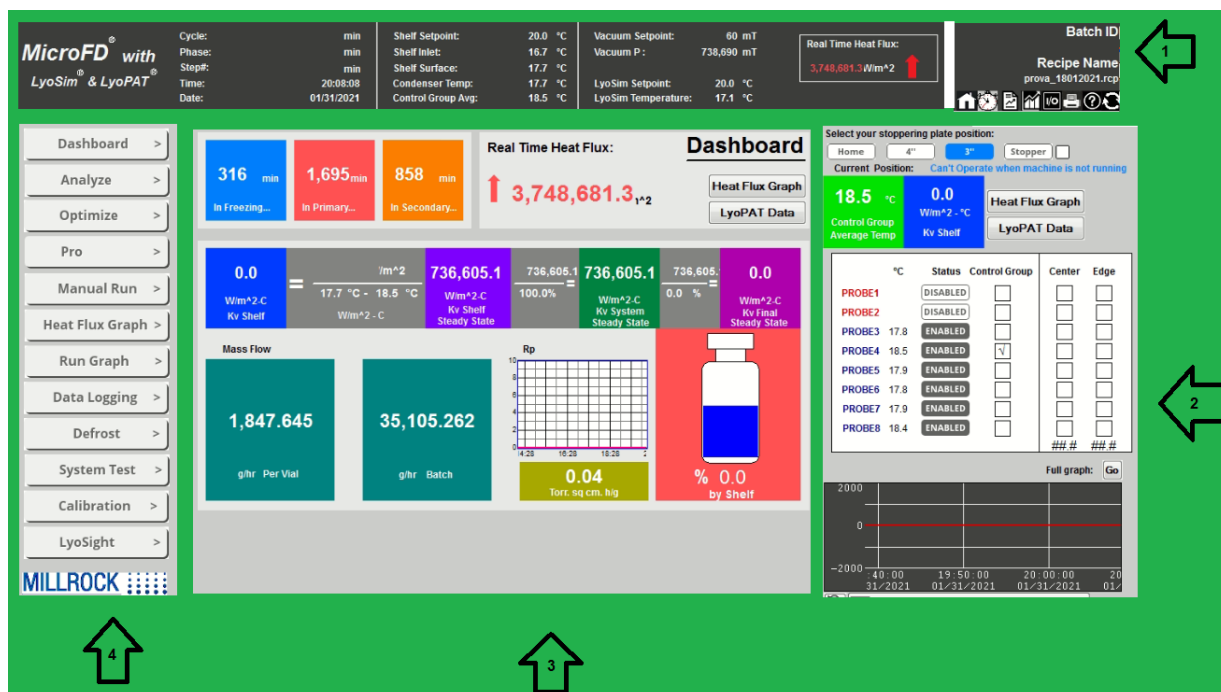


Figura 20 Interfaccia e componenti principali del LyoPat

In questa interfaccia è possibile distinguere 4 sezioni. Nella prima, che si trova nella parte superiore dello schermo, si possono osservare le informazioni principali del sistema e anche vedere i dati che riguardano ogni ciclo in corso: il tempo trascorso in ciascuna delle fasi del sistema, poi i valori di temperatura dei componenti principali come il condensatore, lo *shelf*, la media delle termocoppie e quella del *LyoSim*; inoltre, in questo riquadro ci sono anche informazioni sulla pressione del sistema misurata dai manometri Baratron e Pirani.

Nella seconda sezione c'è la possibilità di selezionare la posizione del coperchio superiore del liofilizzatore, vedere il coefficiente di trasferimento di calore K_v , selezionare e configurare il numero di termocoppie attive per il calcolo della media. Come opzioni nel posizionamento del coperchio ci sono 3 configurazioni: Home, 4" e 3", queste opzioni sono solo abilitate quando la pressione del sistema è circa di 500.000 mTorr. Dall'altra parte le termocoppie riportano valori in gradi Celsius, e accanto a ogni termocoppia c'è la opzione "*Enabled*" o "*Disabled*", consentendo la abilitazione o disabilitazione di ogni termocoppia; inoltre, per la abilitazione delle termocoppie utilizzate per il calcolo della "*Control Group Average Temp*" c'è una casella anche accanto ad ogni termocoppia che permette di selezionarle.

La terza sezione mostra informazioni in tempo reale del flusso di massa, il coefficiente K_v e la resistenza al trasporto di vapore nel cake R_p .

Nell'ultima sezione si hanno i collegamenti che guidano alle diverse modalità operative della apparecchiatura. In questo studio ne sono state utilizzate 4: *Analyze*, *Optimize*, *Manual Run* e *Defrost*. In figura 21 si vede lo schermo a disposizione nel *Analyze Mode* con un esempio di ricetta.

Recipe Name: prova_18012021.rcp 🕒 **START CYCLE** **Analyze Mode**

Product Name: Andres_controlled_2Cm_sosta-5 📄 🖨️ 📁 📧 📧

Product #: sucrose10% Auto Backfill: **On** 400 mT

Description: prova 21 Auto Stoppering: **On**

Loading: **Off** Ready? **Go** **BATCH INFO**

Shelf °C 0.0 Critical Temp (Tc) °C -20.0

LyoSim °C 0.0 Concentration %w/w 5.0 Vial OD cm 2.23 Water per vial g 3.0

Number Of Vials 19 Vial ID cm 2.20 Vial Mass g 16.18

FREEZING

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Shelf Temp °C	20	20	-3	-3	-50	-50	0	0	0	0
Time min	0	20	23	70	47	80	0	0	0	0
LyoSim Track From:	10		Track Offset: 0.0 °C							

FINAL FREEZE

Shelf Temp °C -45.0

Hold Time min 0

Primary Vac Start mT 500

PRIMARY DRYING

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Shelf Temp °C	-45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Time min	0	45	1,650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pressure mT	60	60	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LyoSim Track From:	9		Track Offset: -3.0 °C													

Auto EOPD **DISABLED**
Activate on Step#

SECONDARY DRYING

Shelf Ramp °C/min 1.0 Pressure 60 mT

Shelf Temp °C 20.0 LyoSim 10

Time min 9,999 Track Offset: °C 0.0

STORAGE SETPOINT

Shelf Temp °C 20.0

LyoSim Temp °C 20.0

ALARM SETTINGS

Cond Overload °C -40.0

Vacuum Overload mT 2,000

Power Outage min 10

Figura 21 Schermo a disposizione nel *Analyze Mode*

La modalità *Analyze* permette di configurare in maniera manuale la ricetta durante il processo di liofilizzazione, sia cambiando le temperature e pressioni di ogni parte del processo oppure il tempo in cui il sistema rimarrà in ciascuna di esse. Nella parte superiore c'è a disposizione uno spazio per indicare nome e specificare il tipo di prova che si sta realizzando. Poi ci sono 4 riquadri dove si ha la vera configurazione della ricetta:

- **Batcht info:** In questo riquadro si inserisce la informazione sul lotto di prova, la concentrazione della soluzione, il numero di flaconi, la dimensione dei flaconi utilizzati, il loro peso e la quantità di soluzione in ciascuno di questi flaconi; inoltre, si specifica la temperatura critica del prodotto, che è quella che non può essere superata in nessuna delle fasi.
- **Freezing:** Questo riquadro permette configurare la fase di congelamento, considerando fino a 10 step. Sono state utilizzate parecchie ricette di congelamento durante questo lavoro di tesi, essendo questo lavoro di tesi focalizzato su questa fase: nelle ricette più complesse si arriva a 6 step, in quelle più semplici 4. Nel formulare una ricetta c'è bisogno di 2 step iniziali fondamentali, uno è far arrivare lo *shelf* alla temperatura iniziale del processo 20 °C nel minor tempo possibile (indicando tempo=0), poi questa

temperatura deve esser mantenuta per almeno 5 min, per far arrivare tutti i flaconi alla stessa temperatura, a questo punto tutte le ricette cominciano a cambiare dipendendo se si vuole fare un sosta ulteriore all'avvio della nucleazione per stabilizzare i flaconi, oppure si vuole andare direttamente a congelare il prodotto (caso più semplice). Nel caso più complesso quello che si deve fare è scegliere una temperatura dove si vuole fare la sosta prima della nucleazione, ad esempio -3 °C, poi si definisce la rampa di congelamento se si è inizialmente a 20°C e si vuole arrivare a -3 °C con una rampa di 1 °C/min si sceglie un tempo di 23 min, a questo punto si rimane a -3 °C fino a stabilizzare tutti i flaconi (60 min normalmente bastano). Come ultimo step che è quello dove accade il congelamento si deve definire di nuovo una rampa a una temperatura obiettivo ad esempio 1 °C/min fino a -50 °C, quindi dobbiamo andare a questa temperatura in 47 min, poi si rimane a -50 per almeno 60 min per assicurare di uniformare la temperatura in tutti i flaconi. Un'altra cosa importante da considerare è che queste temperature nella ricetta sono quelle di *setpoint* dello *shelf*. Inoltre, in questa fase si può configurare il LyoSim in base ad un *offset*, questo offset deve essere scelto rispetto ad un valore tra le opzioni che offre il software: tutte le termocoppie, il "*Control Group Average Temp*" e lo *shelf*. Il valore di questo offset può essere fra +15 °C e -15 °C rispetto al valore scelto.

- **Primary drying:** Questo riquadro è molto simile a quello precedente, solo con la differenza che è possibile manipolare la pressione della apparecchiatura oltre alla temperatura, e ci sono a disposizione più step per la ricetta (16 in questa fase). Per gli esperimenti fatti se sono utilizzati solo 2 di questi step, il primo per raggiungere la temperatura e pressione nel minor tempo possibile, in questo caso 0 °C e 60 mTorr, e un secondo step dove si sono mantenute queste condizioni per un tempo di 9999 min, il massimo permesso per il software. Questa fase viene terminata manualmente quando la pressione del Pirani è uguale a quella del manometro capacitivo, oppure molto vicina ad essa. Anche qua si può configurare nella stessa maniera fatta per il *Freezing* il *LyoSim*, essendo indipendente dalla configurazione fatta nella fase precedente.
- **Secondary drying:** In questo ultimo riquadro si configura l'essiccamento secondario: le opzioni sono diverse dalle altre parti, ma molto semplici da configurare. Qua si sceglie direttamente la rampa di temperatura per arrivare alla temperatura obiettivo, si sceglie la temperatura obiettivo che è quella dove si vuole realizzare l'essiccamento secondario, si configura il tempo per cui si vuole rimanere nella fase e per ultimo si sceglie la pressione che si vuole mantenere durante la fase. Inoltre, la configurazione del *LyoSim* è anche disponibile in questa fase.

In figura 22 si osserva lo schermo a disposizione quando si è in *Optimize Mode*.

Recipe Name: prova_18012021.rcp
Product Name: Andres_controlled_2Cm_sosta-5
Product #: sucrose10%
Description: prova 21

Auto Backfill: On 400 mT
Auto Stoppering: On

Optimize Mode
Enter Critical Parameters

Select your optimization mode here: Loading: Off
FreezeBooster®: None Auto
Freezing Method: Recipe AccuFlux
Primary Drying Method: Recipe AutoDry

BATCH INFO
Percent Qshelf % 100.0 Num of Vials 19
Concentration %w/w 5.0 Vial OD cm 2.23
Critical Temp (Tc) °C -20.0 Vial ID cm 2.20
Water mass per vial g 3.0 Vial Mass g 16.18

FREEZING
Step: 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
FreezeBooster® After STEP #: 4
°C 20 20 -3 -3 -50 -50 0 0 0 0
min 0 20 23 70 47 80 0 0 0 0
LyoSim Track From: 10 Track Offset: 0.0 °C

End SC Based on Heat Flow ☐
End FRZ Based on Heat Flow ☐
EXTRA FREEZE
Shelf Temp °C -45.0
Hold Time min 0
Primary Vac Start mT 500

PRIMARY DRYING
Step: 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Shelf Temp °C -45 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Time min 0 45 1,650 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Pressure mT 60 60 60 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
LyoSim Track From: 9 Track Offset: -3.0 °C

Auto EOPD DISABLED
Activate on Step#:

SECONDARY DRYING
Shelf Ramp °C/min 1.0 Vacuum mT 60
Shelf °C 20.0 LyoSim 10
Time min 0.000 Track Offset: 0.0 °C

STORAGE SETPOINT
Shelf °C 20.0
LyoSim °C 20.0

ALARM SETTINGS
Cond Overload °C -40.0
Vacuum Overload mT 2,000
Power Outage min 10

Figura 22 Schermo a disposizione nel Optimize Mode

La modalità *Optimize* ha solo una grande differenza rispetto alla modalità *Analyze*: questa anche ci permette di scrivere le ricette nella stessa maniera con le stesse configurazioni, ma si ha la possibilità di realizzare la nucleazione controllata. La nucleazione controllata viene avviata attraverso una nuova configurazione che si trova nella parte superiore chiamata “FreezeBoster”: questa deve essere impostata su *Auto*, così permettendo l’uso della nebbia di ghiaccio, e si deve poi scegliere lo step della fase di *freezing* dove si vuole l’avvio della nucleazione, in questo caso il software permette di scegliere lo step prima all’avvio della nucleazione, come si vede in figura 22, lo step dovrebbe aver inizio nello step 5 se lo si configura col numero 4.

Inoltre, la nucleazione controllata nel Micro-FD non viene avviata solo dal configurare la modalità *Optimize*: si deve anche fare qualche passaggio su il *Manual Mode*. In figura 23 si osserva lo schermo durante l’uso del *Manual Mode*.



Figura 23 Schermo a disposizione nel *Manual Mode*

Il **Manual Mode** permette di gestire manualmente ogni parte del Micro-FD, come la temperatura di set-point dello *shelf*, la temperatura di set-point del *LyoSim*, controllare la pressione dell'apparecchiatura, gestire la valvola di isolamento fra condensatore e la camera di liofilizzazione e, finalmente, quello che interessa per il lavoro di Tesi, generare la nebbia di ghiaccio per la nucleazione controllata. Quest'ultima configurazione è possibile se si seguono una serie di passaggi e il contenitore di acqua da cui essa è prelevata per la nebbia è collegato e caricato. I passaggi a seguire sono:

1. Accensione dell'*Atomizer* per almeno 2 minuti, questo è necessario affinché l'acqua venga atomizzata.
2. Apertura della valvola di nucleazione (*Nuc valve*) che connette il condensatore con la pompa d'acqua.
3. Accensione del *Nuc priming*, necessario per poter ottenere l'innesco della nucleazione, il riquadro a destra non deve avere la spunta verde come si vede in figura 23, nel caso sia così occorre spegnere il Micro-FD e riaccenderlo.
4. Accensione della pompa dell'acqua: questa comincerà a prelevare una quantità d'acqua preimpostata per attivarsi, 5 ml bastano.
5. Accensione del condensatore, impostando una temperatura adeguata, per riuscire a generare la nebbia di ghiaccio.

Una volta siano stati terminati tutti questi passaggi e l'acqua sia stata tutta prelevata, apparirà una spunta verde, questa indica che è avvenuta l'attivazione della pompa per la nucleazione.

La modalità *Defrost* permette di alzare la temperatura del condensatore, sciogliendo in questo modo il ghiaccio formato durante tutto il ciclo di liofilizzazione, e recuperando l'efficienza del condensatore velocemente dopo ogni ciclo. Per avviare il *Defrost* si deve indicare il tempo che si vuole per sciogliere il ghiaccio, con un massimo di 30 min, ma normalmente dopo un ciclo normale di liofilizzazione 15 minuti possono bastare.

2.3 Descrizione delle prove sperimentali

Le prove sono state realizzate tutte nella apparecchiatura Micro-FD sempre usando saccarosio alla pressione di 60 mTorr e temperatura del ripiano a 0 °C, cambiando in tutte le prove la ricetta durante la fase di congelamento, per poi nella seconda fase della sperimentazione si sono ripetute le stesse prove con la nucleazione controllata utilizzando l'*Optimize Mode*. In questa sezione si vanno a specificare le metodologie e procedure adottate per ogni prova, inoltre si presentano i calcoli che sono stati effettuati per arrivare ai valori di K_v e R_p in ogni esperimento.

2.3.1 Calcolo di K_v e R_p

Il valore del K_v è stato trovato sapendo che questo valore dipende delle condizioni operative: nel caso delle prove in questa Tesi sempre a 60 mTorr (8 Pa) e 0 °C, il valore di K_v è al intorno di 17 W/m²K (Velez Ramirez, 2019).

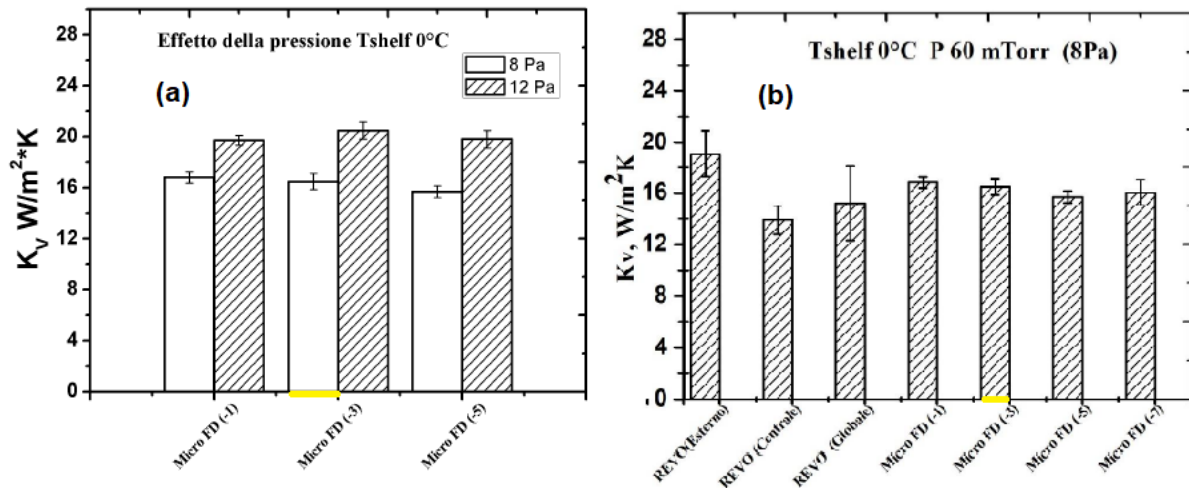


Figura 24 Effetto della pressione(a) e temperatura del ripiano(b) sul valore K_v (immagini tratte da Velez Ramirez, 2019, modificate).

Per arrivare al valore di R_p in ogni esperimento c'è stata una elaborazione dei dati. In figura 25 si presenta il sistema in esame.

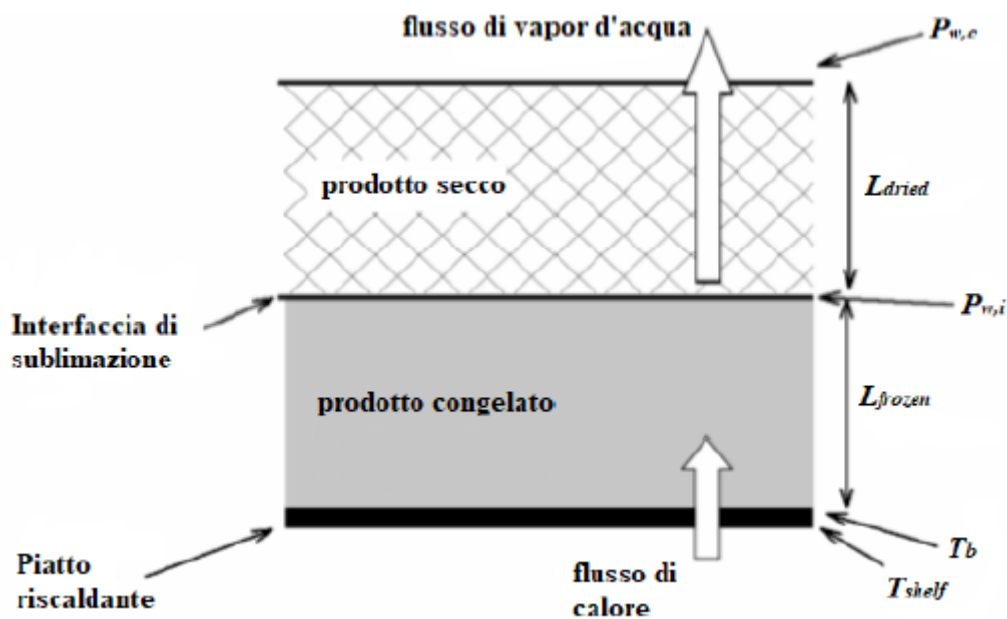


Figura 25 diagramma e parametri principali per il modello matematico del processo di liofilizzazione durante l'essiccamento primario (immagine tratta da Giordano, Fissore, & Barresi, 2011, modificata)

Una volta che si conosce il valore del coefficiente di scambio K_v è possibile attraverso una serie di calcoli trovare il parametro desiderato (R_p) rispetto allo spessore del prodotto secco

(*L_{dried}*). Per fare ciò, viene utilizzata la equazione (4) che relaziona la resistenza al flusso di vapore con la pressione parziale del vapore d'acqua nella camera ($P_{w,c}$), la pressione del vapore d'acqua all'interfaccia di sublimazione ($P_{w,i}$) e il flusso di sublimazione (J_w). Nel caso da valutare, $P_{w,c}$ può essere approssimata con la pressione della camera di liofilizzazione (P_c) poiché l'atmosfera della camera è composta principalmente da vapore d'acqua. Inoltre, il flusso di sublimazione si trova attraverso l'equazione (5) che si ricava dal bilancio d'energia: questa lega il flusso di calore (J_q) e il calore di sublimazione (ΔH_s) col J_w , ulteriormente il valore del flusso di calore si conosce attraverso l'equazione (2) già conoscendo il coefficiente K_v , la temperatura dello *shelf* e quella del prodotto.

$$R_p = \frac{P_{w,i} - P_{w,c}}{J_w} \quad (4)$$

$$J_w = \frac{J_q}{\Delta H_s} \quad (5)$$

2.3.2 Procedure ed elenco delle prove sperimentali

Nel seguito si illustra la procedura utilizzata in ciascuna delle prove che verranno elencate, con piccole variazioni che saranno segnalate dove necessario. La procedura è stata la seguente:

Materiali e Attrezzature

- a) 2 beaker (250 mL) uno per preparare la soluzione e l'altro per i rifiuti.
- b) 1 beaker (150 mL) per collocare la soluzione filtrata.
- c) 1 Erlenmeyer (250 mL) per l'acqua.
- d) 1 PTFE filter 0.22 μ m.
- e) 1 siringa 10 mL.
- f) 1 magnete per mescolare.
- g) 1 cucchiaino.
- h) 150 mL d'acqua ultrafiltrata/distillata.
- i) Saccarosio.
- j) 5 termocoppie + tappi TC speciali.
- k) Flaconi (19 6R + 14 tappi “*two legs*”)
- l) 1 Pipetta con la sua rispettiva punta.
- m) Bilancia digitale.
- n) Agitatore magnetico.
- o) Micro-FD

Preparazione delle soluzioni

1. Pulire lo spazio di lavoro che sarà utilizzato con etanolo 70%.
2. Collocare il beaker con il magnete nella bilancia digitale e pesare la soluzione in massa/base di massa. (esempio 10 gr di saccarosio + 90 gr d'acqua=100 gr soluzione al 10% saccarosio m/m).
3. Solubilizzare la soluzione con l'agitatore magnetico a 150 rpm per 5 min (oppure quando non si vedano più particelle del soluto).
4. Con la siringa e il filtro, si filtra la soluzione in un altro beaker, facendo attenzione che il filtro non si stacchi.
5. Per assicurare la purezza, "pulire" il beaker, i flaconi e la punta della pipetta con alcune gocce della soluzione filtrata prima e poi mettere nel beaker i rifiuti.
6. Riempire i flaconi con la quantità di soluzione desiderata in volume (per 6R 3 mL).
7. Chiudere parzialmente i flaconi con i tappi (così permettendo la sublimazione), lasciando senza tappi i falconi dove si mettono le termocoppie.
8. Collocare le termocoppie toccando il centro dei flaconi nel fondo.

Avvio del Micro-FD

1. Accendere la pressa di corrente.
2. Accendere il Micro-FD.
3. Accendere il computer.
4. Aprire la valvola di aria (valvola rossa indietro l'apparecchiatura nella parte superiore).
5. Aprire la valvola d'acqua (valvola rossa indietro l'apparecchiatura nella parte inferiore).
6. Assicurarci che non ci sia acqua nel condensatore e poi chiudere la valvola blu (ad un lato dell'apparecchiatura)
7. Aprire il software del Micro-FD.
8. Scegliere la modalità del ciclo di operazione (*Analyze*, *Optimize*, *manual* o *Defrost*) dipendendo di quello che si vuole fare.
9. Impostare le condizioni del batch (congelamento, essiccamento primario e secondario).
10. Chiedere la camera di liofilizzazione, verificando la gomma bianca stia sigillando correttamente l'aria.
11. Avviare in ciclo e aspettare fino che il "*vacuun seal cheack*" sia finito e gli step di congelamento abbiano inizio.
12. Tornare per l'avvio dell'essiccamento primario, per garantire che tutto proceda senza problemi e che venga raggiunto il corretto vuoto.

Nella Tabella 1 si visualizza l'elenco delle prove realizzate durante questo studio.

Tabella 1 Elenco di prove effettuate.

N° Prova	Modalità	Soluto	T_{shelf} (°C)	P_c (mTorr)	T_{LyoSim} (°C)	T_{sosta} (°C)	Rampa (°C/min)
1	Analyze	Saccarosio 5%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	0.5
2	Analyze	Saccarosio 5%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	1
3	Analyze	Saccarosio 5%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	2
4	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	0.5
5	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	1
6	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	N/A	2
7	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	-3	0.5
8	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	-3	1
9	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -5 freezing	-3	2
10	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-3	0.5
11	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-3	1
12	Analyze	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-3	2
13	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-3	0.5
14	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-3	1
15	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-4	1
16	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-5	0.5
17	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-5	1
18	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-5	2
19	Optimize	Saccarosio 10%	0 °C	60	T _{av} -3	-7	1
20	Optimize	Saccarosio 10%	-20 °C	60	T _{av} -3	-5	0.5
21	Optimize	Saccarosio 10%	-20 °C	60	T _{av} -3	-5	1
22	Optimize	Saccarosio 10%	-20 °C	60	T _{av} -3	-5	2

Per ciascuna delle prove è stata modificata la fase di congelamento, sempre cambiando la rampa di congelamento, poi la concentrazione della soluzione. Inoltre, solo con la seconda concentrazione si è provata una ricetta che include una sosta previa al congelamento totale, e per ultimo si decide di fare lo stesso ma provando con la modalità *Optimize* (nucleazione controllata). In tabella il riferimento alla parola “freezing” è per sapere che il *LyoSim* è stato avviato durante la fase di congelamento, se non c’è si deve a che solo ha funzionato durante la fase d’essicamento primario.

Le prime prove sono state fatte per verificare l’effetto della velocità di raffreddamento rispetto alla concentrazione del prodotto, poi le prove successive sono state effettuate per vedere gli effetti di una nuova strategia di congelamento che è questa cosiddetta “sosta”, cioè uno step di stabilizzazione prima di iniziare col congelamento, le ultime prove avevano l’obiettivo di verificare l’influenza della nucleazione controllata nella liofilizzazione, avendo anche applicato le strategie di congelamento prima viste.

3. Risultati e discussione

In questo capitolo sono discussi i risultati ottenuti in ciascuno degli esperimenti condotti nel liofilizzatore Micro-FD. L'analisi sarà focalizzata sulle due prime fasi della liofilizzazione (congelamento, essiccamento primario), valutando i profili di temperatura, pressione e la resistenza al trasferimento di massa (R_p). Successivamente, si analizzeranno gli effetti delle diverse strategie di congelamento sull'essiccamento primario, ovvero le rampe di temperatura e la nucleazione controllata, tutto questo coll'obiettivo di trovare le condizioni ideali di congelamento per avere un essiccamento più efficiente e sicuro per il prodotto.

3.1 Studio dell'effetto della velocità congelamento con nucleazione spontanea

3.1.1 Effetto della concentrazione del prodotto

In questa parte verranno analizzati i risultati delle prove a una specifica concentrazione (5% saccarosio), per vedere quanto sono influenzati da un cambio nella rampa di temperatura. In figura 26 si vedono i profili di temperatura dei flaconi monitorati, considerando essere il tempo zero quello a cui avviene la nucleazione, in presenza di diverse rampe di raffreddamento.

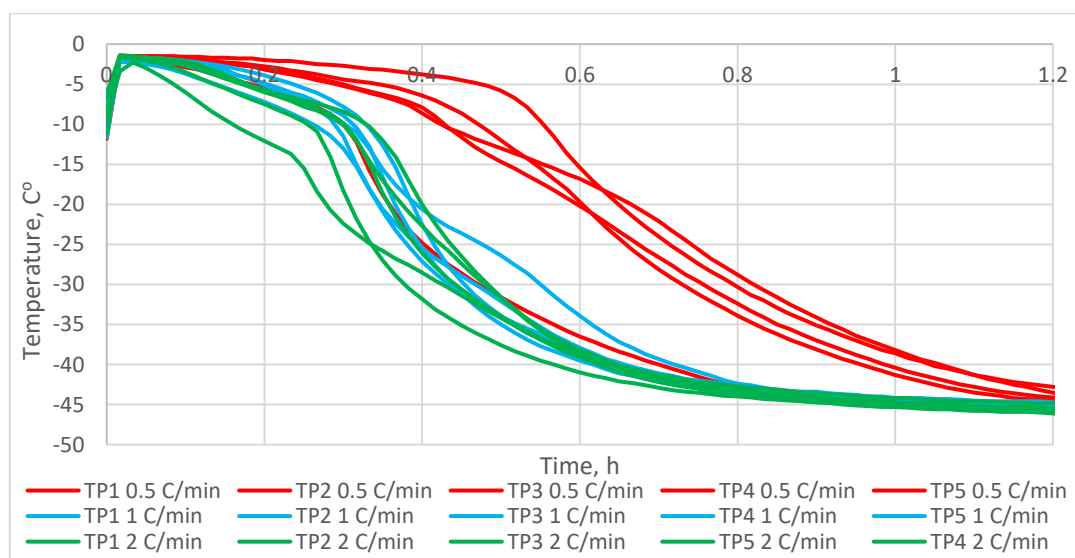


Figura 26 Fase di congelamento nei flaconi monitorati con le diverse rampe di diminuzione di temperatura. Set point Lyosim -5°C di offset rispetto la temperatura della termocoppia #1, soluzione 5% saccarosio.

Nel grafico si vede che i flaconi si raffreddano sempre più velocemente quando si è ad una velocità di raffreddamento maggiore, risultato che ci si aspettava, comunque alcune termocoppie sperimentano una diminuzione della temperatura molto più veloce anche essendo alla velocità di raffreddamento di 0.5 °C/min, probabilmente dovuto all'effetto del *LyoSim*, facendo raffreddare molto più velocemente i flaconi di bordo. Inoltre, la temperatura si mantiene sempre nello stesso range anche quando si è cambiata la rampa di raffreddamento. Le figure successive riportano i profili di temperatura ogni flacone monitorato delle prove al 5 % saccarosio alle diverse rampe di raffreddamento.

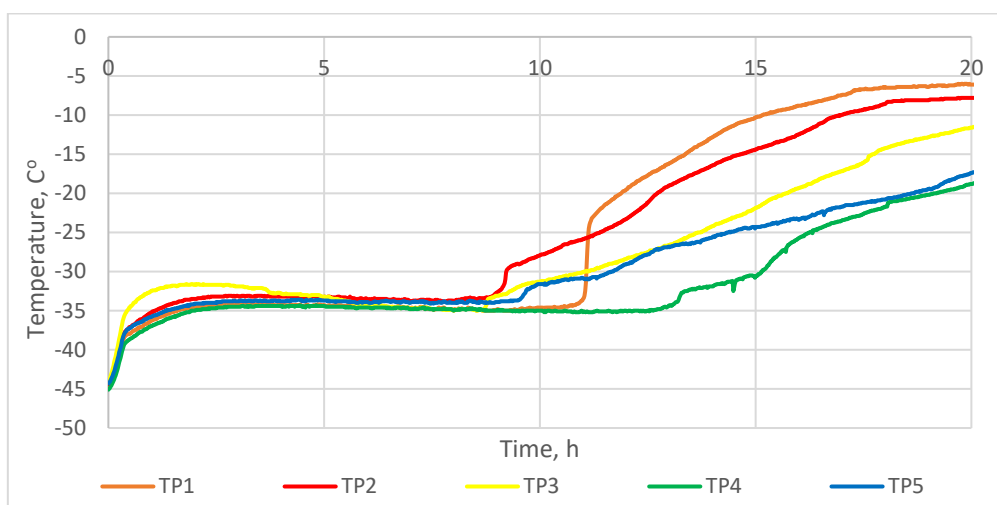


Figura 27 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati. Rampa di congelamento 0,5 °C/min, soluzione 5% saccarosio.

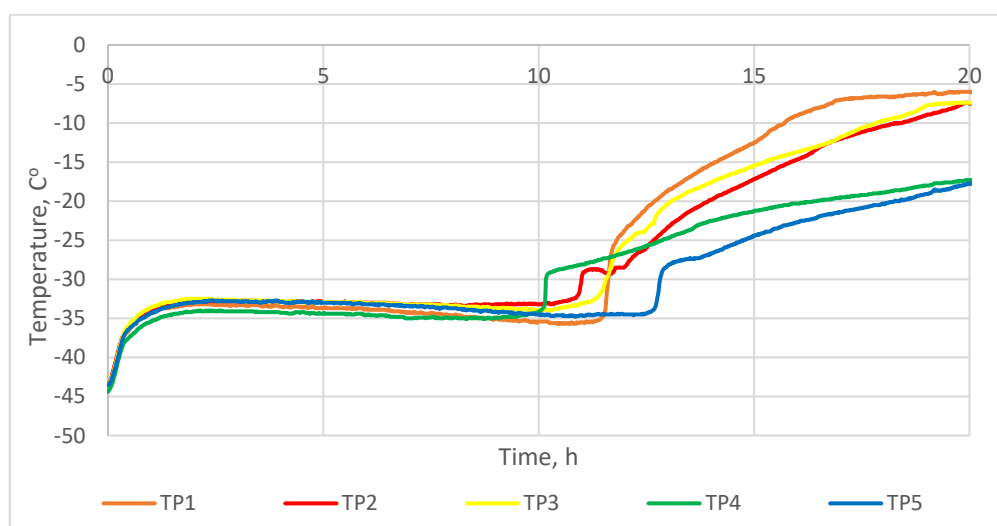


Figura 28 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati. Rampa di congelamento 1 °C/min, soluzione 5% saccarosio.

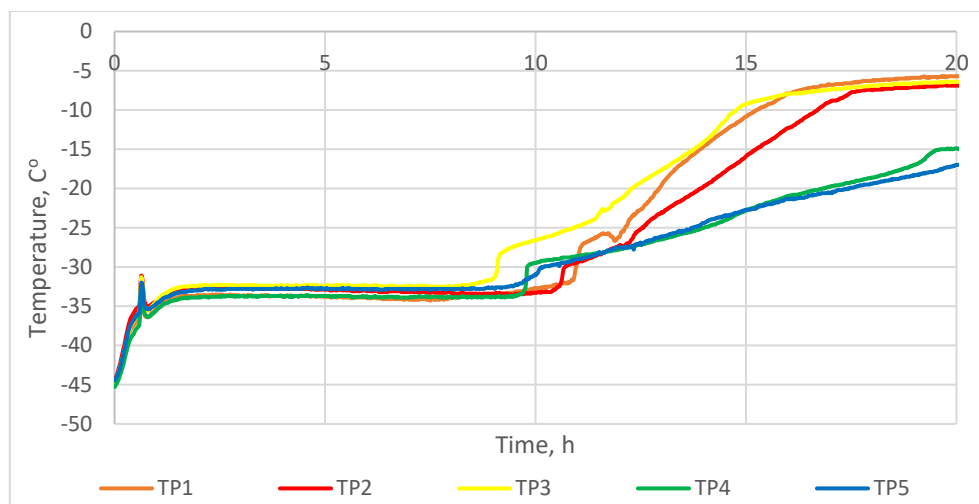


Figura 29 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati. Rampa di congelamento 2 °C/min, soluzione 5% saccarosio.

Si capisce dai grafici che i flaconi non presentano dinamica omogenea, completando la fase di essiccamento a tempi differenti, ma questo è un risultato normale considerando che si è in un processo di liofilizzazione con nucleazione spontanea. I valori di temperatura del prodotto non presentano significative differenze nelle tre prove, così come non è significativamente differente il tempo di completamento della fase di essiccamento, come del resto ci si potrebbe aspettare date le minime differenze osservate nella evoluzione della temperatura nella fase di congelamento.

Nella seguente figura si vedono i distinti profili di pressione delle prove al 5% saccarosio alle distinte rampe di raffreddamento durante l'essiccamento primario.

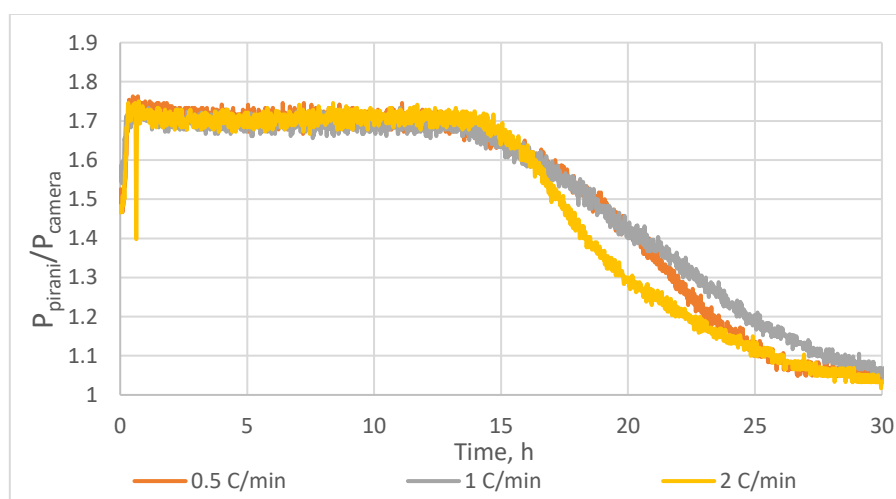


Figura 30 Pressione pirani/pressione camera nucleazione spontanea set point. Lyosim -5 °C offset rispetto la temperatura della termocoppia #1 durante la fase di congelamento, soluzione 5% saccarosio.

Dal grafico si intuisce che tutte le 3 prove hanno un profilo quasi identico, cioè finiscono più meno allo stesso istante e la pressione diminuisce più meno alla stessa velocità.

Nella figura 31 si vede la resistenza al trasporto di massa di vapore del cake rispetto alla coordinata assiale nelle prove al 5% saccarosio alle diverse rampe di raffreddamento.

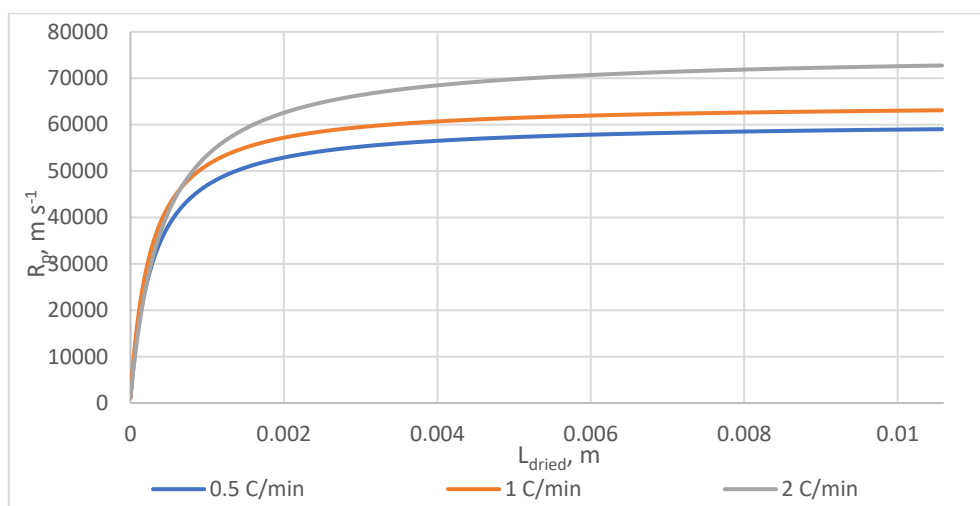


Figura 31 R_p in funzione di L_{dried} nel caso di nucleazione spontanea soluzione 5% saccarosio.

In figura come era d’aspettarsi si vede che la resistenza minore si trova con una rampa di raffreddamento a 0.5 °C/min, ma di nuovo i risultati sono così simili da non poter dire che c’è stato un effetto dovuto alle diverse rampe, questo può doversi a la bassa concentrazione del prodotto che non si vede influenzata dalle diverse strategie di congelamento. Quindi un aumento nella concentrazione può esser necessario per studiare questi effetti.

3.1.2 Effetto d’una sosta e la temperatura LyoSim durante il congelamento.

In questa sezione si analizzano i risultati delle prove a una concentrazione maggiore (10% saccarosio), con una sosta a -3 °C coll’obiettivo di aver tutti i flaconi alle stesse condizioni prima del congelamento. In figura 32 si osservano i profili di temperatura nei flaconi considerando anche qui pari a zero il tempo di avvio della nucleazione nelle prove al 10% saccarosio con sosta a -3 °C e alle diverse rampe di raffreddamento.

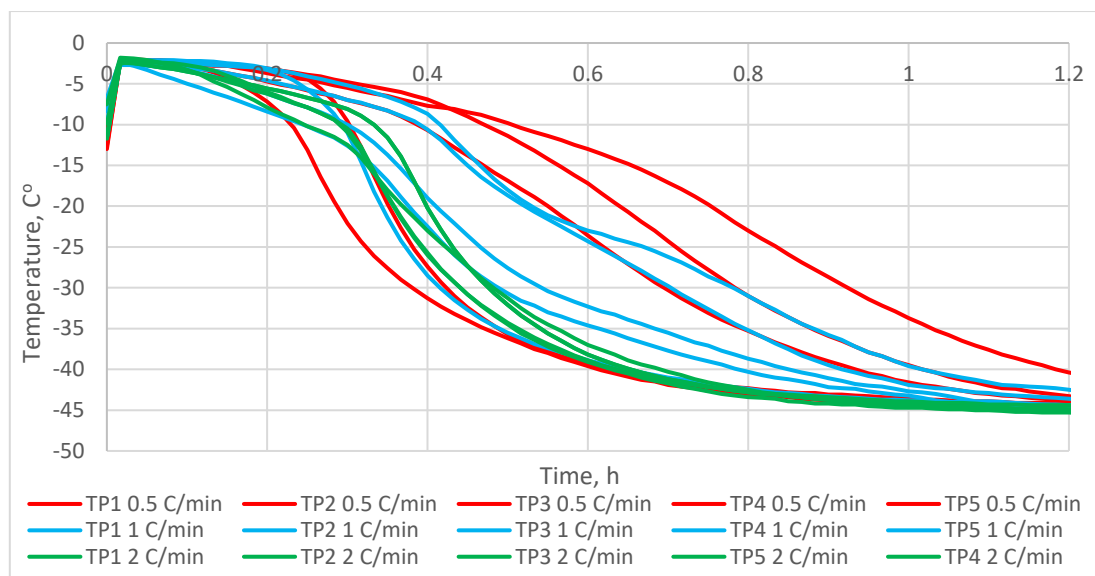


Figura 32 Fase di congelamento nei flaconi monitorati con le diverse rampe di diminuzione di temperatura e sosta -3 °C, set point Lyosim -5 °C di offset rispetto la temperatura della termocoppia #1 durante la fase di congelamento, soluzione 10% saccarosio.

Si osservano alcuni risultati anomali, ad esempio flaconi che con rampa a 0.5 °C/min e 1 °C/min dovevano raffreddarsi molto più lentamente e si sono raffreddati ancora più veloce che i flaconi con rampa a 2 °C/min: questo è dovuto all'offset del *LyoSim* scelto, potendo raffreddare di più i falconi ai bordi che normalmente con una rampa maggiore dovevano essere molto più caldi. Inoltre, con la rampa a 2 °C/min compaiono risultati abbastanza omogeni, avendo quasi tutti i flaconi quasi la stessa storia termica. Nelle prossime figure si osserva la storia termica di ognuno dei flaconi monitorati delle prove al 10% saccarosio con una sosta a -3 °C e alle diverse rampe di raffreddamento durante l'essiccamento primario.

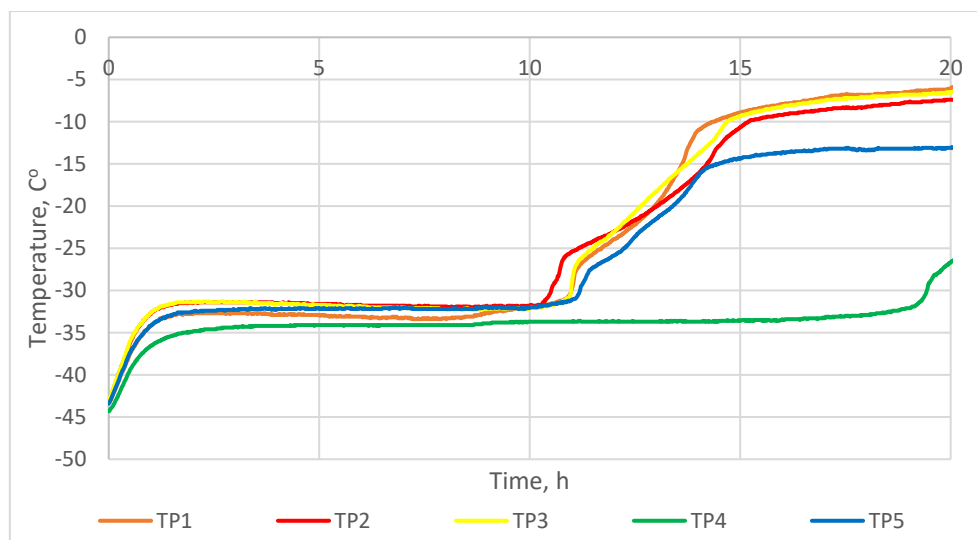


Figura 33 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati, rampa di congelamento 0.5 °C/min, sosta -3 °C, soluzione 10% saccarosio.

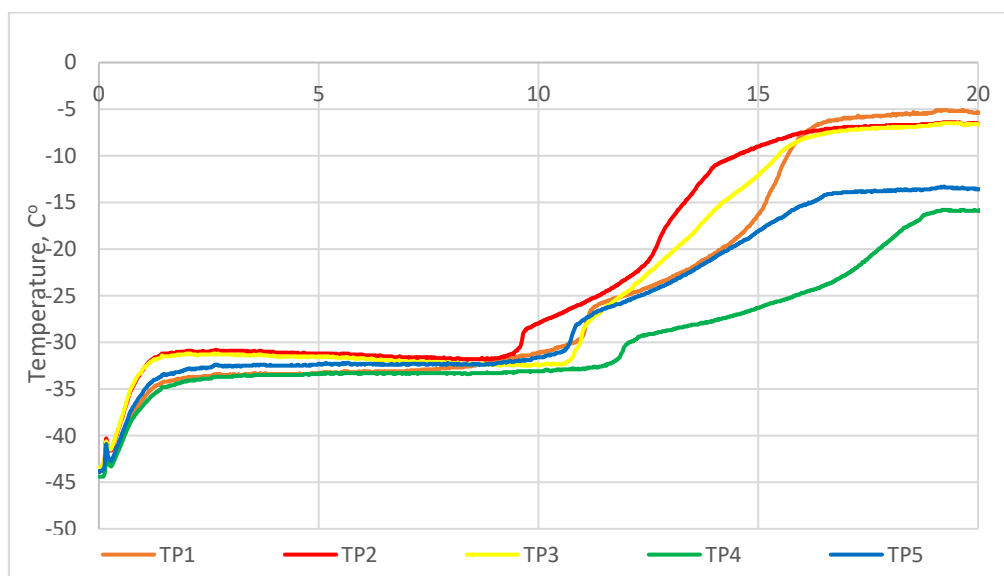


Figura 34 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati, rampa di congelamento 1 °C/min, sosta -3 °C, soluzione 10% saccarosio.

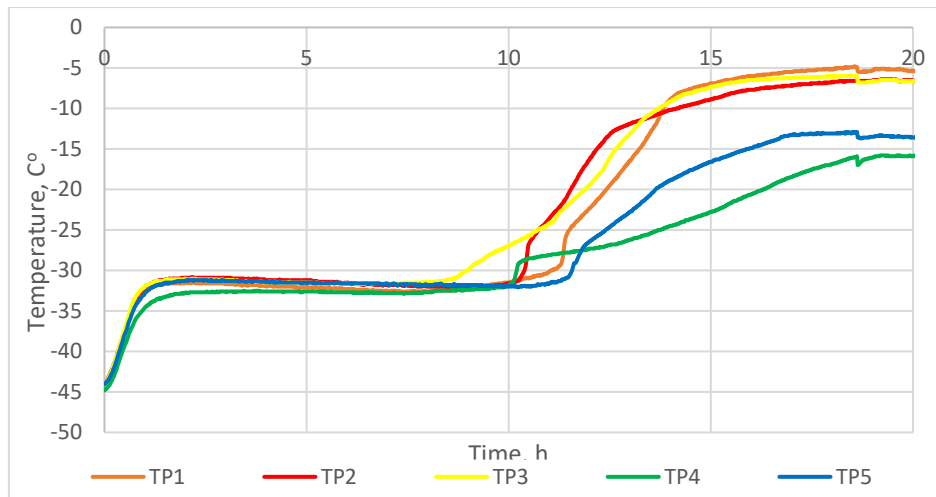


Figura 35 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati, rampa di congelamento 2 °C/min, sosta -3 °C, soluzione 10% saccarosio.

La storia termica nelle 3 prove mostra che i risultati ottenuti durante il congelamento portano anche ad avere delle anomalie nell'essiccamento primario: si vede che i flaconi nel caso della rampa a 0.5 °C/min che dovevano asciugarsi prima si asciugano in ritardo rispetto alla prova che doveva finire più lentamente (2 °C/min). Questo per la non omogeneità del batch che, anche avendo preparato i flaconi con una sosta a -3 °C nella fase di congelamento, non hanno avuto storie termiche simili né risultati molto più distinti a quelli ottenuti senza l'uso d'una sosta.

Si capisce che una sosta per la omogeneizzazione porta a valori di temperatura media più bassi prima del congelamento, che a sua volta porta a valori dell'anello più bassi che hanno un effetto maggiore sulle prove in cui ha un raffreddamento più lento, portandoli a basse temperature e seguendo un'altra temperatura che non è quella dello *shelf*. In figura 36 si riportano i profili di pressione delle prove al 10% saccarosio con sosta -3 °C alle diverse rampe di temperatura e il *LyoSim* con un offset di -5 °C rispetto alla media durante l'essiccamento primario.

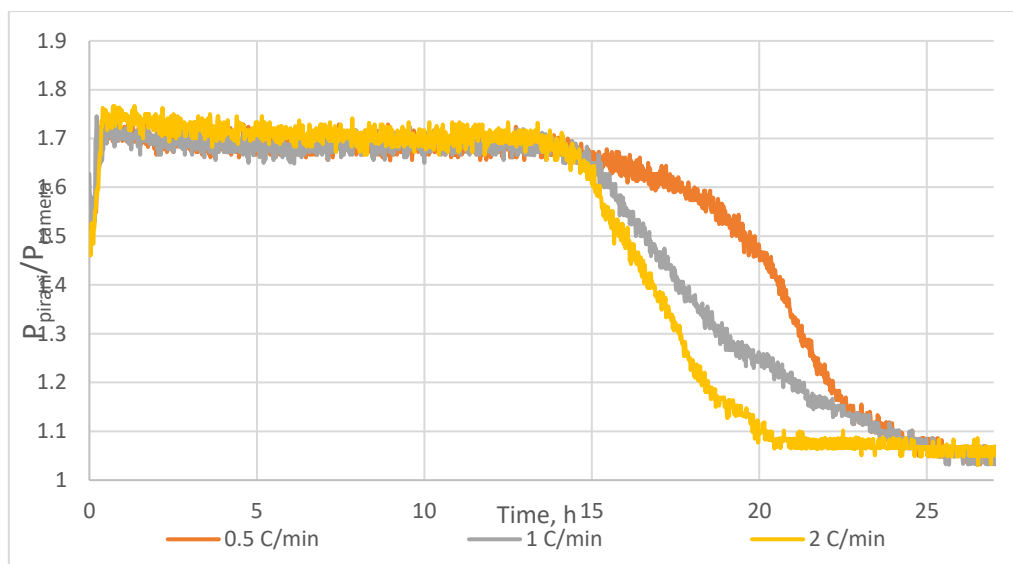


Figura 36 Pressione pirani/pressione camera, nucleazione spontanea sosta -3 °C, soluzione 10% saccarosio.

In questa figura si conferma il risultato anormale prima visto con le storie termiche dei flaconi: si vede che la prova che sarebbe dovuto finire per prima è quella che è finita per ultima.

Si vuole quindi verificare che gli effetti della sosta non siano stati influenzati dall'uso dell'anello, e quindi le prove nel seguito sono state effettuate col *LyoSim* seguendo la temperatura dello *shelf* con un offset di 0 °C, ma solo durante la fase di congelamento. Da un'altra parte si vuole anche verificare che il *LyoSim* non abbia generato interferenze durante l'essiccamento primario. Nelle figure nel seguito si riporta la storia termica dell'anello e la temperatura media dei flaconi monitorati delle prove al 10% saccarosio con sosta -3 °C alle diverse rampe di raffreddamento durante la fase d'essiccamento primario.

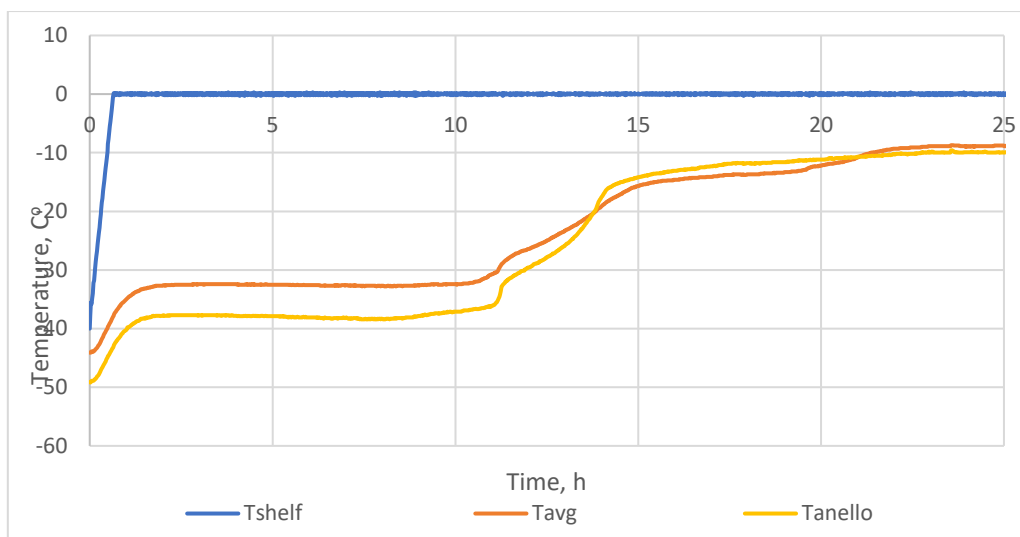


Figura 37 Interferenza temperatura anello nell'essicamento primario, rampa congelamento 0,5 °C/min, soluzione 5% saccarosio.

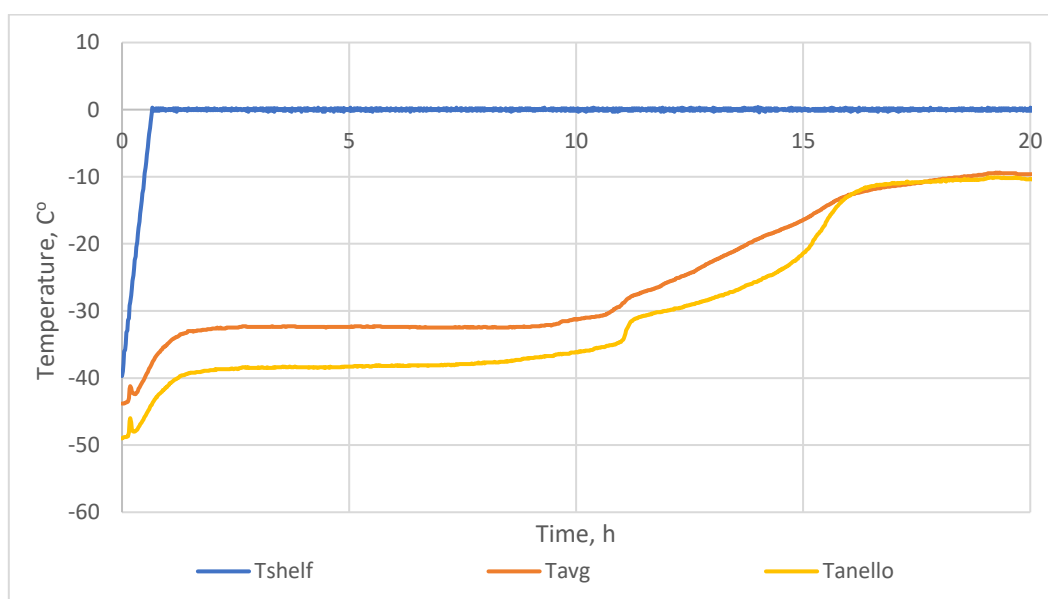


Figura 38 Interferenza temperatura anello nell'essicamento primario, rampa congelamento 1 °C/min, soluzione 5% saccarosio.

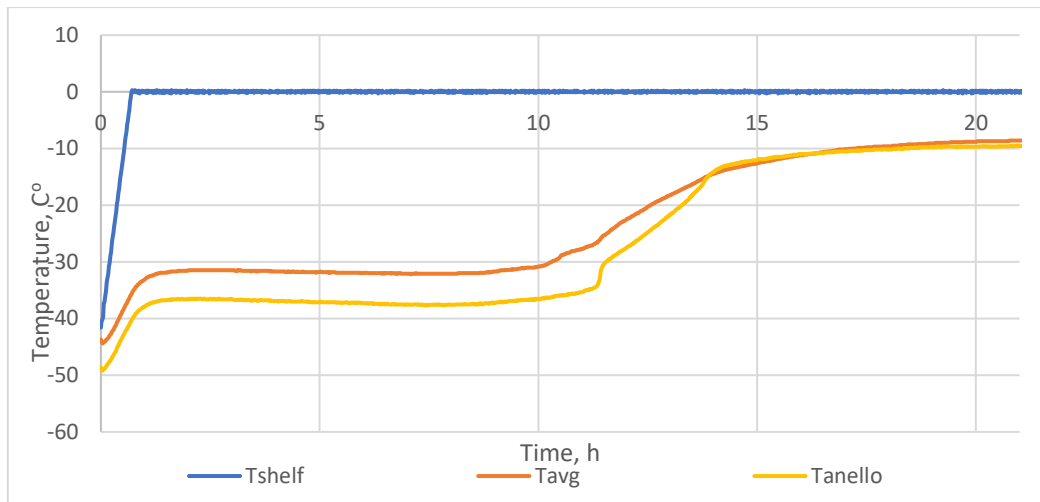


Figura 39 Interferenza temperatura anello nell'essiccamento primario rampa congelamento 0,5 °C/min soluzione 5% saccarosio.

Si vede nelle figure che c'è un risultato anomalo poiché nelle 3 prove l'anello supera la temperatura media dei flaconi, quando in realtà la temperatura dell'anello doveva essere sempre a -5 °C di offset rispetto a questa media, cosa che non sta succedendo: questa poteva essere un'altra causa dei risultati anomali che si avevano ottenuto, ma questo fenomeno è dovuto alla configurazione utilizzata per la realizzazione delle prove, dove veniva considerata solo la temperatura della termocoppia centrale per il calcolo della temperatura media usata per ricavare la temperatura di setpoint dell'anello. Cioè, la temperatura dell'anello è la temperatura del flacone centrale meno 5 °C, questo permette capire il perché la temperatura dell'anello sale in certo punto e supera quella media, questo accade quando il flacone centrale comincia ad asciugarsi. Comunque, il comportamento anomalo dove non segue la media si riporta solo alla fine del processo, quindi non genera grandi effetti sul risultato finale. Come ulteriore considerazione, si decide di fare le prove con una temperatura di -3 °C di offset rispetto alla media durante l'essiccamento primario, per evitare una possibile interferenza dell'anello anche durante questa fase.

Nelle figure successive si visualizzano le storie termiche dei diversi flaconi monitorati delle prove con la soluzione al 10% di saccarosio realizzate con diverse rampe di raffreddamento, una sosta a -3 °C, e considerando le nuove configurazioni del *LyoSim* durante l'essiccamento primario.

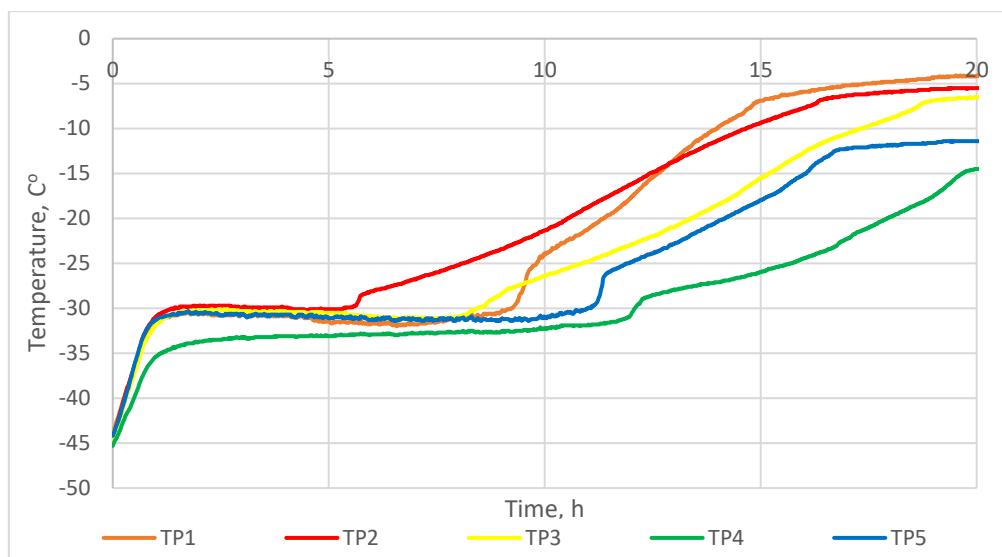


Figura 40 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati rampa di congelamento 0,5 °C/min, sosta -3 °C, nuove condizioni operative LyoSim, soluzione 10% saccarosio.

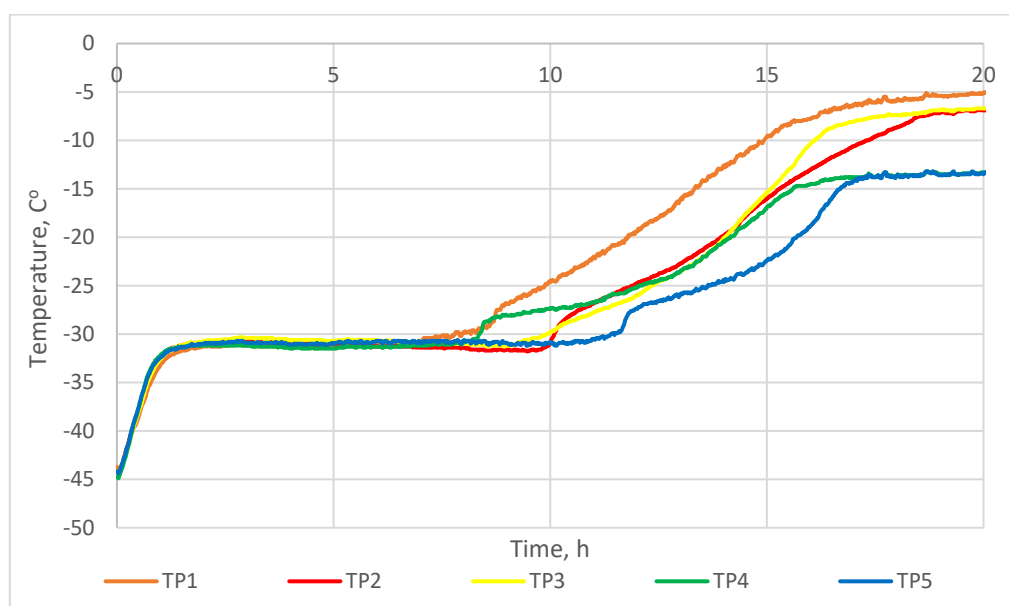


Figura 41 Temperatura del prodotto nei flaconi monitorati rampa di congelamento 1 °C/min sosta -3 °C nuove condizioni operative Lyosim soluzione 10% saccarosio.

I risultati mostrano che anche cambiando la configurazione dell'anello i flaconi continuano ad essere poco omogenei, avendo tutti storie termiche molto diverse rispetto agli altri. Da un'altra parte, non ci sono flaconi che si asciugano con tante ore in ritardo rispetto agli altri, come si vedeva nelle prove precedenti con il *LyoSim* nella configurazione originale. La figura 43 mostra i profili di pressione delle prove al 10% saccarosio realizzate con diverse rampe di raffreddamento una sosta a -3 °C e considerando le nuove configurazioni del *LyoSim*.

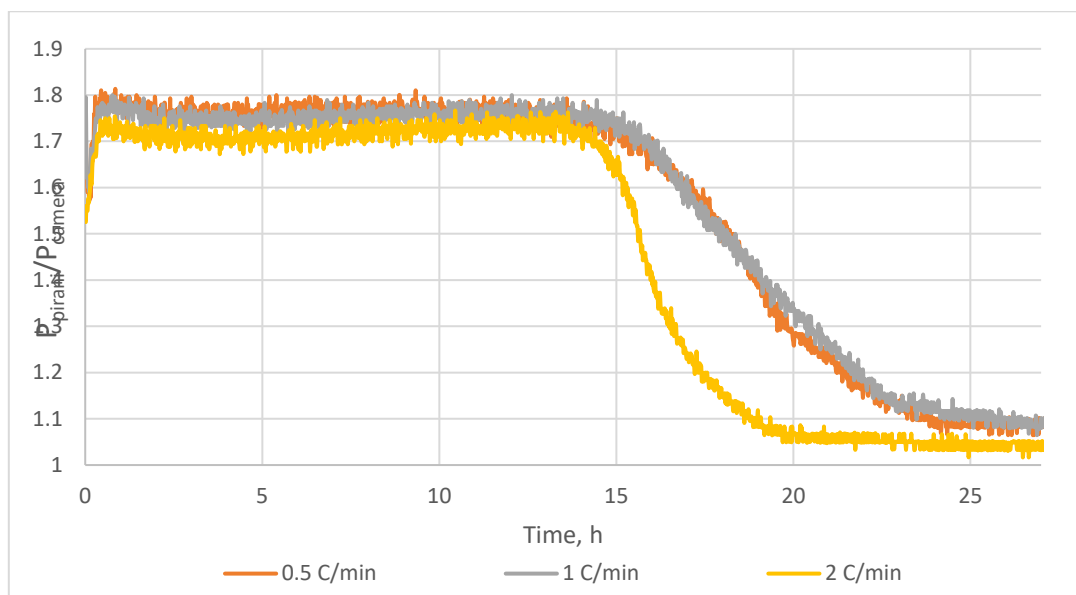


Figura 42 Pressione pirani/pressione camera nucleazione spontanea sosta -3°C , nuove condizioni operative Lyosim, soluzione 10% saccarosio.

Questi risultati mostrano chiaramente che una volta in cui si è minimizzata l'interferenza dell'anello nella fase di essiccamento, il cambio di velocità di raffreddamento ha un effetto minimo e quasi nullo sulla velocità dell'essiccamento primario, finendo prima solo per poco il caso di $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rispetto a quella di $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, inoltre quella con velocità di raffreddamento a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ riporta un risultato anomalo, finendo prima che le altre due prove quando si aspettava che finisse per ultima, comunque non diverge in grande maniera. Quindi, per avere maggior impatto sui risultati e sulla velocità del *primary drying* probabilmente si ha bisogno di una apparecchiatura con maggior capacità di raffreddamento. Si decide d'operare sempre con questa nuova configurazione del *LyoSim* per le prove successive, essendo questa quella che interferisce di meno nel processo.

3.2 Studio dell'effetto della velocità congelamento con nucleazione controllata

3.2.1 Influenza della temperatura di nucleazione

Questo segmento dello studio è stato focalizzato sullo studio della influenza della nucleazione controllata sull'essiccamento primario: Si analizzano i risultati delle prove con saccarosio al 10% a diverse temperature di nucleazione, sempre utilizzando la stessa rampa di raffreddamento. In figura 44 si mostrano i confronti dei profili di pressione delle prove precedenti alle stesse condizioni di rampa di raffreddamento e sosta di temperatura, in questo

caso -3 °C e rampa 1 °C/min e una prova nuova con nucleazione controllata al 10% saccarosio, con rampa raffreddamento 1°C/min e sosta -3°C.

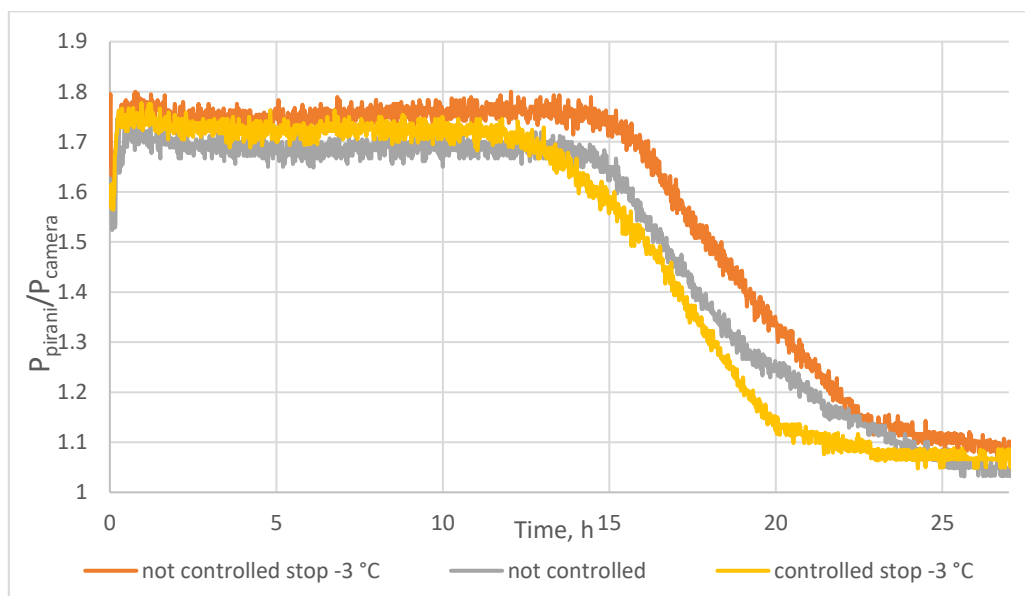


Figura 43 Comparazione pressione pirani/camera dei 3 metodi di essiccamento usati soluzione 10% saccarosio.

Si osserva che non c'è una grande differenza fra una prova realizzata con nucleazione controllata e con le altre strategie, essendo tutte curve molto simili, con un minimo anticipo nella conclusione della fase di essiccamento in presenza di nucleazione controllata. Nella figura 45 si vede la storia termica durante l'essiccamento primario di uno dei flaconi monitorati nella prova con nucleazione controllata a -3 °C al 10% saccarosio.

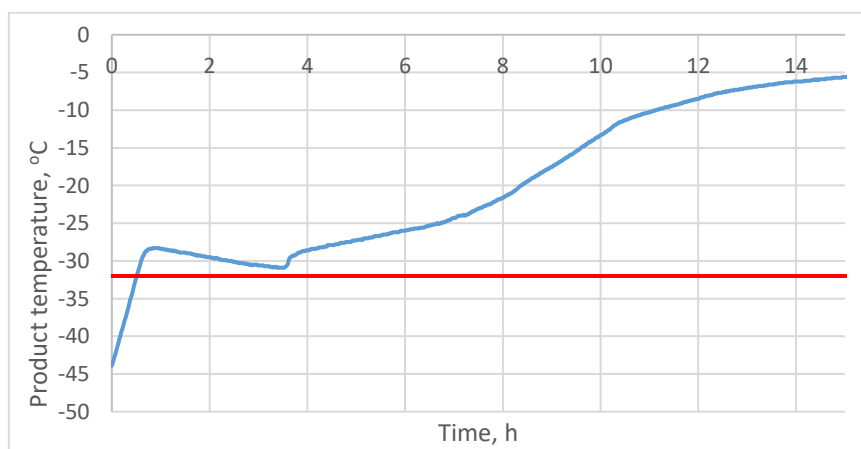


Figura 44 Temperatura del prodotto in uno dei flaconi durante l'essiccamento primario nucleazione controllata sosta -3 °C soluzione 10% saccarosio.

I risultati fanno vedere evidentemente che la temperatura è salita troppo rispetto alla soglia di stabilità della struttura del prodotto, essendo questa $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, e potendo arrivare quella del prodotto durante la prova a circa $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$: questo dimostra che c'è stato un forte collasso durante la prova, essendo questa la ragione dei risultati precedenti, dove non c'era una grande differenza fra una prova con nucleazione controllata o con quella spontanea. Si decide di ripetere la prova alle stesse condizioni per verificare la ripetibilità del collasso. La figura 46 mostra il confronto fra la prima prova con nucleazione controllata a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e rampa raffreddamento $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e un'altra prova alle stesse condizioni fo.

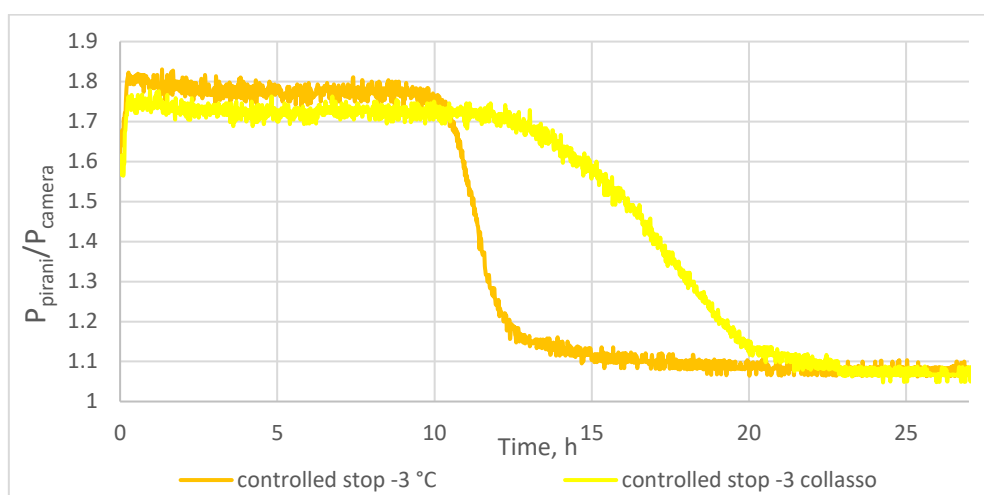


Figura 45 Confronto pressione pirani/camera nucleazione controllata sosta $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, con collasso e senza collasso, soluzione 10% saccarosio.

Questo risultato evidenzia come probabilmente nella precedente prova ci sia stato un qualche errore da parte dell'operatore. La seconda prova realizzata finisce quasi 8 ore in anticipo rispetto a quella fatta prima, senza collassi nei flaconi, questo anche conferma che la nucleazione controllata è un metodo molto utile che permette di guadagnare tempo, ottenendo circa un 40% di guadagno del tempo rispetto alle prove effettuate senza nucleazione controllata.

Adesso si andrà a verificare l'effetto di avviare la nucleazione controllata a diverse temperature, in questo caso $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per questo serve la figura 47 dove si confrontano le prove con nucleazione controllata al 10% saccarosio, rampa di raffreddamento $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con le diverse temperature di nucleazione.

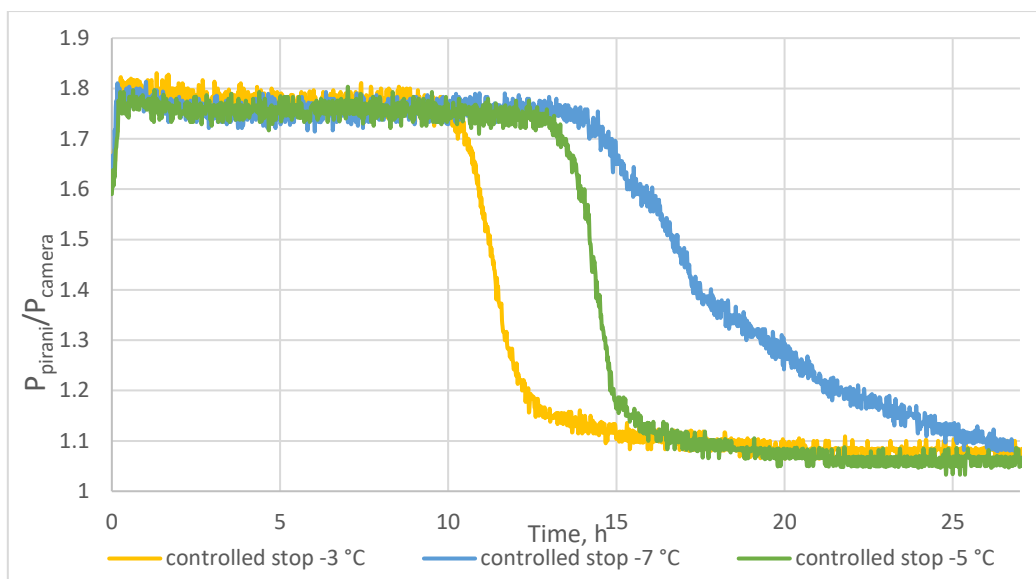


Figura 46 Confronto pressione pirani/camera nucleazione controllata a -3 °C, -5 °C e -7 °C, soluzione 10% saccarosio.

Dalla figura precedente si osserva come una temperatura di nucleazione maggiore porti ad una riduzione del tempo di essiccamento, come atteso. Nelle prossime figure si vedono le storie termiche dei flaconi monitorati durante la fase di congelamento con nucleazione controllata al 10% saccarosio, rampa di raffreddamento 1 °C/min e le diverse temperature di nucleazione.

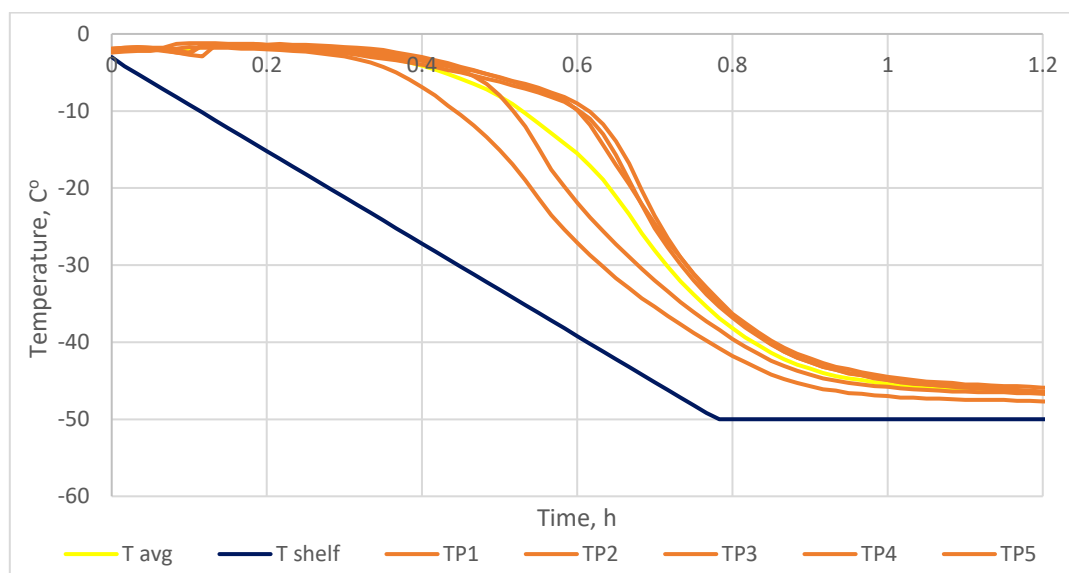


Figura 47 Fase di congelamento nei flaconi monitorati con nucleazione controllata a -3 °C, soluzione 10% saccarosio.

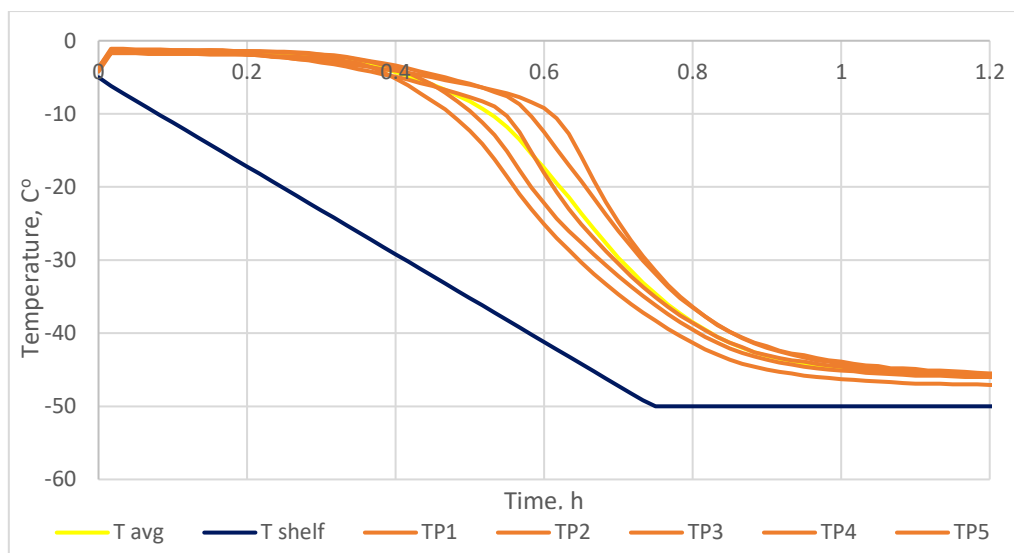


Figura 48 Fase di congelamento nei flaconi monitorati con nucleazione controllata a -5 °C, soluzione 10% saccarosio.

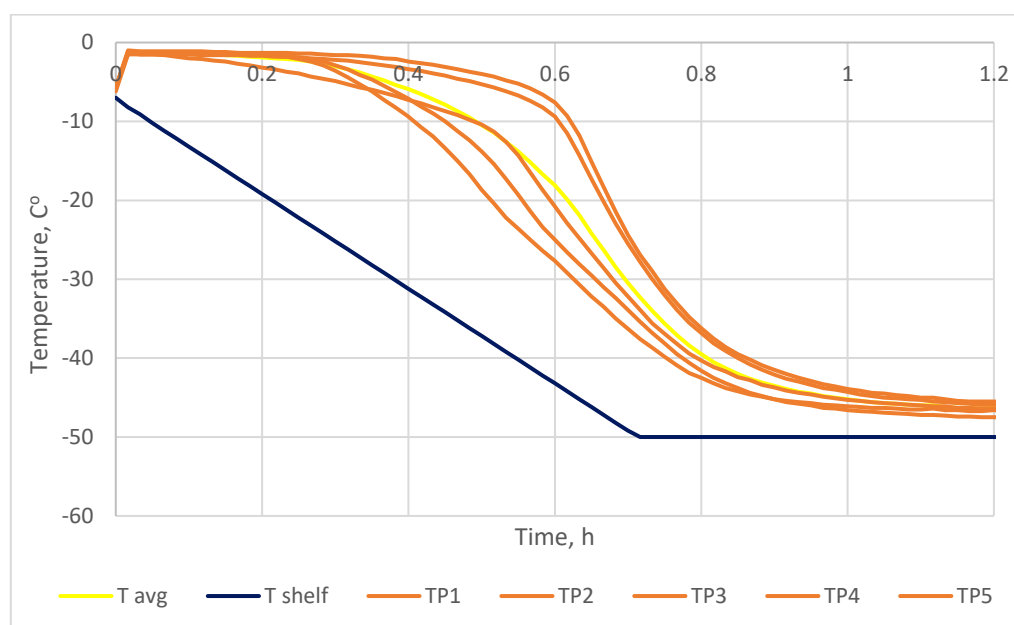


Figura 49 Fase di congelamento nei flaconi monitorati con nucleazione controllata a -7 °C, soluzione 10% saccarosio.

Guardando le figure si evidenzia come nella prova con nucleazione controllata a -3 °C la temperatura del prodotto è pressoché pari alla temperatura di congelamento, quindi non si osserva la salita caratteristica della temperatura durante la nucleazione. In queste condizioni si formano pochi nuclei che possono accrescere di più, infine formando cristalli di ghiaccio più grandi che portano ad avere un flusso di sublimazione molto meno ostacolato nella fase di essiccamento primario.

Questo fenomeno è da considerare sempre perché affetta tanto il risultato finale ottenuto permettendo controllarlo, ed anche tenendo in conto che generare cristalli di ghiaccio così grandi porta ad avere anche pori del cake molto grandi, che a sua volta diminuiscono la velocità dell'essiccamento secondario, quindi ha degli effetti su entrambi le fasi d'essiccamento durante la liofilizzazione. Inoltre, la nucleazione controllata dimostra essere un metodo affidabile e riproducibile, portando tutti i flaconi su una storia termica molto simile

3.2.2 Influenza della velocità di raffreddamento

Questa sezione dello studio è stata finalizzata a capire l'influenza della velocità di raffreddamento, mantenendo la stessa temperatura di nucleazione: le prove sono state fatte con una soluzione di 10% saccarosio. In figura 50 si vedono i profili di pressione delle prove fatte con una temperatura di nucleazione a -5 °C e cambiando la velocità di raffreddamento, con una soluzione di 10% saccarosio.

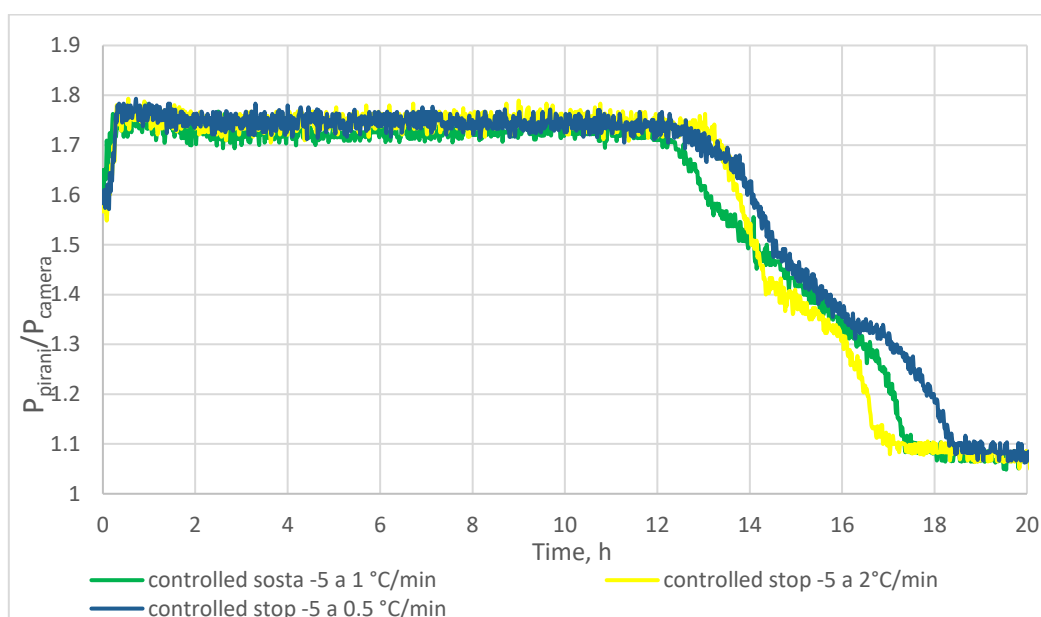


Figura 50 Confronto pressione pirani/camera nucleazione controllata sosta -5 °C, soluzione 10% saccarosio.

Si intuisce dalla figura che le tre prove hanno un comportamento quasi identico, quindi l'effetto della velocità di raffreddamento risulta trascurabile anche in presenza di un processo di nucleazione controllata: per aver un effetto più notevole nei risultati c'è bisogno di velocità di raffreddamento ancora più alte. Inoltre, le prove tendono a mostrare un collasso del prodotto

essiccato in queste condizioni di temperatura di ripiano, per cui si decide di andare a testare temperature più basse per verificare che questo fenomeno non stia influenzando i risultati.

3.2.3 Influenza della temperatura del ripiano.

Questa sezione dello studio mira a verificare se la temperatura del ripiano che generava dei collassi interferisse coll'effetto della velocità di raffreddamento. Quindi sono state condotte prove con nucleazione controllata, alla stessa temperatura di nucleazione cambiando la velocità di raffreddamento e un'altra temperatura di ripiano. Nella figura 51 si vedono i profili di pressione delle prove effettuate a diverse velocità di raffreddamento con una temperatura di nucleazione a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e una temperatura di ripiano di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una soluzione di 10% saccarosio.

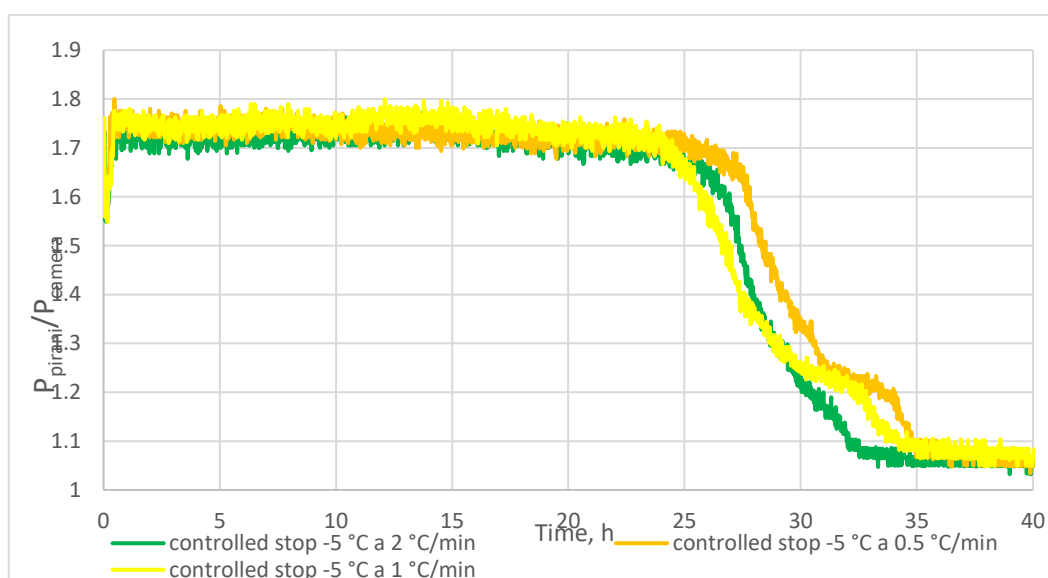


Figura 51 Confronto pressione pirani/camera nucleazione controllata sosta $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con temperatura del ripiano a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, soluzione 10% saccarosio.

Si osserva in figura che i risultati hanno di nuovo delle curve molto simili, questo permette assumere che l'influenza della velocità di raffreddamento è minima, nell'intervallo di valori preso in esame. Dall'altra parte si osserva che l'essiccamento primario impiega più tempo a finire molto con una temperatura di ripiano minore: questo è un risultato che si aspettava, comunque le prove finiscono senza problemi di collasso come invece si aveva nel caso di temperatura di ripiano a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Conclusioni

Il presente lavoro coll'uso del Micro-FD è stato focalizzato sullo studio della liofilizzazione prestando attenzione alla fase di congelamento del processo, fase che può cambiare di tanto il risultato finale del processo. Questo tipo d'apparecchiatura ha una tecnologia chiamata "*freezebooster*" che permette di ottenere la nucleazione controllata attraverso *ice fog*, anche avendo un controllo molto preciso sulla temperatura durante tutte le fasi del processo: tutto questo garantisce la conduzione delle prove a condizioni quasi identiche; inoltre si può operare con una piccola quantità di materia prima, evitando lo spreco di materiale e tempo, ed anche simulando quello che accadrebbe in una apparecchiatura industriale: questo è dovuto ad un'altra tecnologia "*LyoSim*" che ha la funzione di riscaldare in modo differente i flaconi di bordo, in questa maniera ottenendo un lotto con caratteristiche più omogenee.

Nella prima parte di questo lavoro di Tesi il funzionamento del liofilizzatore Micro-FD è stato caratterizzato attraverso una serie di prove condotte utilizzando una soluzione acquosa al 5% e 10% in peso di saccarosio, contenuta in flaconi di dimensioni 6R, pressione di camera 60 mTorr, usando la nucleazione spontanea, temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario 0 °C, e cambiando solo le rampe di raffreddamento. Lo studio condotto in questa prima parte della Tesi ha portato alle seguenti conclusioni:

1. L'effetto delle diverse rampe di temperatura di raffreddamento osservato nelle prove realizzate a una concentrazione minore, in questo caso 5% saccarosio, hanno mostrato minime differenze nei profili di pressione e nei valori di resistenza al trasporto di vapore del cake, mentre nelle prove a maggiore concentrazione si osservano differenze nei profili di pressione che non possono esser trascurati. Quindi servono concentrazioni di soluzione maggiori per avere un effetto non trascurabile rispetto ai cambi durante la fase di congelamento.

Nella seconda parte di questo lavoro di Tesi il funzionamento del liofilizzatore Micro-FD è stato caratterizzato attraverso una serie di prove condotte utilizzando una soluzione acquosa al 10% in peso di saccarosio, contenuta in flaconi di dimensioni 6R, pressione di camera 60 mTorr, usando la nucleazione controllata con la tecnologia "*ice fog*", temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario 0 °C e poi -20°C, dove cambiano solo le rampe di raffreddamento e la temperatura dove si avvia la nucleazione. Nelle prove si osserva l'omogeneità del lotto durante la fase di congelamento ed essiccamento primario attraverso l'analisi del profilo di temperatura di ciascuna delle termocoppie, e ulteriormente i profili di pressione di ognuna delle prove. Lo studio condotto in questa seconda parte della Tesi ha portato alle seguenti conclusioni:

1. L'influenza della temperatura di nucleazione sull'essiccamento primario permette di vedere nei profili di pressione che più vicina sia la temperatura di nucleazione a quella di congelamento, più veloce sarà finalizzata la fase d'essiccamento primario. Potendo concludere che la temperatura di nucleazione ha un effetto grande sui cristalli di ghiaccio del cake, più alta sia questa temperatura, più grandi saranno i cristalli di ghiaccio risultando in un tempo di finalizzazione dell'essiccamento primario minore.
2. L'effetto delle diverse rampe di raffreddamento a diverse temperature di ripiano e mantenendo sempre la stessa temperatura d'avvio della nucleazione riporta, risultati nei profili di pressioni molto simili. Quindi si può concludere che per avere un effetto dovuto alle rampe di raffreddamento, anche utilizzando il metodo della nucleazione controllata, servono apparecchiature con maggior capacità raffreddante.

5. Bibliografia

Aktiengesellschaft, G. G., 2020. *Fundamentos de la liofilización farmacéutica*. [Online] Available at: <https://www.gea.com/es/customer-cases/freeze-drying-fundamentals.jsp> [Consultato il giorno 8 gennaio 2021].

Barley, J., 2019. *Basic Principles of Freeze Drying*. [Online] Available at: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/> [Consultato il giorno 18 gennaio 2021].

Bosch, A. M., 2019. *Evaluating the Impact of Controlled Nucleation on Processing Bulk Lyophilized Material*. [Online] Available at: https://sp-lineofsight.com/uploads/PDF_Files/Evaluating%20the%20Impact%20of%20Controlled%20Nucleation%20-%20Dr%20Amy%20Bosch.pdf [Consultato il giorno 12 gennaio 2021].

Çengel , Y. A., 2011. *Thermodynamics*. Settima edizione, New York: The McGraw-Hill Companies, Inc..

Conti Dragà, S., 2019. *Studio del processo di liofilizzazione in un micro-liofilizzatore*, Torino: Politecnico di Torino.

Davide , F., Domenico , C. & Riccardo , M., 2019. Monitoring of the freezing stage in a freeze-drying process using IR. *International Journal of Pharmaceutics*, 5(12), pp. 488-499.

Fissore, D., 2017. Model-based PAT for Quality Management in Pharmaceuticals Freeze-drying: State of the Art. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(5), pp. 1-10.

Fissore, D., Pisano, R. & Barresi, A., 2018. Process Analytical Technology for Monitoring Pharmaceutical Freeze-drying—A comprehensive review. *Drying Technology*, 36(15), pp. 1839-1865. Doi: 10.1080/07373937.2018.1440590..

Giordano, A., Fissore, D. & Barresi, A., 2011. On the Use of Mathematical Models to Build the Design Space for the Primary Drying Phase of a Pharmaceutical Lyophilization Process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(13), pp. 311-324.

I.M.A. Industria Macchine Automatiche S.P.A., 2016. *VERISEQ® NUCLEATION*. [Online] Available at: <https://ima.it/pharma/lab4life/veriseq-nucleation/> [Consultato il giorno 11 gennaio 2021].

Incropera, F. P., 1999. *Fundamentos de transferencia de calor*. quarta edizione. Monterey: Pearson education.

Obeidat, W., Sahni, E., Kessler, W. & Pikal, M., 2018. Development of a Mini-Freeze Dryer for Material-Sparing Laboratory Processing with Representative Product Temperature History. *AAPS PharmSciTech*, 19(2), pp. 599-609.

Patapoff , . T. W. & Overcashier, D. E., 2002. *The Importance of Freezing on Lyophilization Cycle Development*. BioPharm, s.l.: s.n.

Pisano, R., Fissore, D. & Barresi, A., 2011. Heat Transfer in Freeze-Drying Apparatus. In: D. M. A. Bernardes dos Santos, a cura di *In Developments in Heat Transfer*. Londra: InTechOpen, pp. 91-114.

Pittino, H., 2015. *La Liofilizzazione come Metodo per il Salvataggio di Beni Cartacei.*, Roma: s.n.

SP Scientific, 2020. *Basic Principles of Freeze Drying*. [Online] Available at: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/> [Consultato il giorno 13 gennaio 2021].

Thompson, T., Wang, Q. & Reiter, C., 2017. *Developing Transferable Freeze Drying Protocols using Accuflux and a MicroFD*. San Diego: Millrock Technology, Inc.

Velez Ramirez, D., 2019. *Uso di un micro-liofilizzatore per lo sviluppo di un processo di liofilizzazione*, Torino: Politecnico di Torino.

6. Notazioni

A_{Rp} Parametro usato per il calcolo di R_p , s^{-1}

A_v Area interna del flacone, m^2

B_{Rp} Parametro usato per il calcolo di R_p , m^{-1}

ΔH_s Calore di sublimazione dell'acqua, $J\ kg^{-1}$

$J_{q,shelf}$ Flusso di calore, $W\ m^{-2}$

J_w Flusso di materia, $kg\ m^{-2}\ s^{-1}$

$K_{v,shelf}$ Coefficiente di scambio di calore rilevato dal MicroFD, $W\ m^{-2}\ K^{-1}$

$K_{v,totale}$ Coefficiente totale di trasporto di calore fra ripiano e prodotto, $W\ m^{-2}\ K^{-1}$

L_{dried} Spessore dello strato sublimante, m

Δm Massa sublimata, kg

P_c Pressione in camera, Pa

$P_{w,c}$ Tensione di vapore dell'acqua nella camera, Pa

$P_{w,i}$ Tensione di vapore dell'acqua all'interfaccia di sublimazione, Pa

R_p Coefficiente di resistenza al trasporto di materia, $m\ s^{-1}$

$R_{p,0}$ Parametro usato per il calcolo di R_p , $m\ s^{-1}$

Δt Intervallo di tempo intercorso tra l'inizio dell'essiccamento ed il termine della prova, h

T Temperatura, $^{\circ}C$

T_b Temperatura del prodotto sul fondo del flacone, $^{\circ}C$

T_{PAvg} Temperatura media del prodotto in camera, $^{\circ}C$

T_c Temperatura di collasso del prodotto, $^{\circ}C$

T_{ring} Temperatura dell'anello LyoSim, $^{\circ}C$

T_{shelf} Temperatura del ripiano termo-controllato, $^{\circ}C$