

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

**Studio dell'impatto dello spray freeze-drying
sull'attività biologica residua di proteine**



Relatori

Prof. Roberto Pisano

Dott.ssa Merve Betul Adali

Candidato

Antonio Cutillo

Dicembre 2021

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Tecniche di essiccamento	2
1.2	Liofilizzazione	3
1.2.1	Congelamento	5
1.2.2	Essiccamento primario	8
1.2.3	Essiccamento secondario	9
1.3	Spray drying	9
1.3.1	Principali tipologie di atomizzatori	10
1.4	Spray Freeze-Drying	11
1.4.1	Potenziati applicazioni in una produzione in continuo dello SFD . .	12
1.5	Stabilità proteica e formulazione	13
1.5.1	Potenziati fonti di perdita di attività biologica nello SFD	14
1.5.2	Meccanismi di protezione proteica	15
1.6	Obiettivo della tesi	16
2	Materiali e metodi sperimentali	17
2.1	Elaborazione del saggio ABTS	17
2.1.1	Individuazione della lunghezza d'onda ottimale	18
2.1.2	Influenza del pH sulla progressione della reazione di ossidazione . .	19
2.1.3	Influenza della concentrazione di mioglobina sull'andamento della reazione di ossidazione	20
2.2	Esecuzione dello Spay Freeze-Drying	21
2.2.1	Caratteristiche delle formulazioni analizzate nelle fasi dello SFD . .	21
2.2.2	Atomizzazione	22
2.2.3	Congelamento/scongelamento	23
2.2.4	Essicamento	24
2.3	Protocollo di analisi dei risultati	26
3	Risultati	29
3.1	Saggio ABTS	29
3.1.1	Lunghezza d'onda ottimale	29
3.1.2	Effetto del pH sulla reazione di ossidazione	32
3.1.3	Effetto della concentrazione di mioglobina sulla reazione di ossidazione	36
3.2	Risultati per le differenti fasi dello SFD	38
3.2.1	Impatto dell'atomizzazione sull'attività biologica	42
3.2.2	Impatto del congelamento/scongelamento sull'attività biologica . .	45
3.2.3	Impatto dell'essiccamento sull'attività biologica	48
4	Conclusioni	53

Elenco dei simboli	55
Abbreviazioni	56
Elenco delle figure	57
Elenco delle tabelle	60
Bibliografia	61
Ringraziamenti	64

Capitolo 1

Introduzione

Al giorno d'oggi, l'uso dei biofarmaci come alternativa ai farmaci convenzionali (sintetizzati chimicamente) sta divenendo sempre più popolare. Essi sono molecole ad alto peso molecolare con strutture complesse ed eterogenee, ottenute a partire da organismi viventi o organismi viventi geneticamente modificati. Rispetto ai farmaci tradizionali, i biofarmaci sono preferiti per la loro maggiore efficacia e selettività (sono utilizzati in terapie specifiche e non hanno applicazioni generiche) e per il minor numero di effetti collaterali che possono causare (grazie alla tecnologia del DNA ricombinante è possibile ottenere molecole esattamente identiche a quelle presenti nell'organismo umano). Nonostante i loro numerosi vantaggi, questa classe di farmaci presenta alcuni svantaggi non trascurabili. Bisogna tener presente che quando si parla di biofarmaci ci si riferisce a aminoacidi, acidi nucleici, ormoni, proteine, proteine ricombinanti ecc. Si tratta, dunque, di una classe di molecole molto ampia, spesso instabili, che risentono fortemente delle condizioni dell'ambiente in cui si trovano, soprattutto se conservate in soluzione acquosa. Variazioni di temperatura, pH, umidità, stoccaggio prolungato ed altre fonti di stress [31], possono causare la perdita dell'attività biologica del principio attivo e possibili effetti collaterali nel paziente al momento della somministrazione. Inoltre, tali molecole, sono fortemente dipendenti dal loro processo di produzione, altamente complesso e costoso. I biofarmaci non sono generalmente stabili in un ambiente liquido; infatti, in esso hanno un'elevata probabilità di subire processi di degradazione e/o denaturazione. Per tale motivo, una fase di essiccamento è solitamente prevista nella parte finale del loro processo di produzione. Tale operazione ha lo scopo di stabilizzare il principio attivo sul lungo periodo, ossia, per tutto il tempo che intercorre tra la produzione e la somministrazione. La rimozione del solvente, nella maggior parte dei casi acqua, permette di ottenere un prodotto anidro che può essere conservato e trasportato in condizioni più agevoli. Esistono diverse tecniche di essiccazione che possono essere utilizzate per l'allontanamento del solvente. Ciononostante, data l'elevata sensibilità dei biofarmaci, solo alcune di esse sono compatibili con le molecole in esame. La tecnica più comunemente utilizzata è la liofilizzazione (Freeze Drying (FD)). Essa è adatta a molecole termolabili come le proteine e permette di preservare le condizioni di sterilità.

La produzione farmaceutica si basa su processi di tipo batch e molte tecniche di essiccamento, come la suddetta liofilizzazione, sono state sviluppate in relazione a ciò. Tuttavia, c'è interesse ad evolvere verso un processo di produzione in continuo poiché potenzialmente vantaggioso in termini di produttività e qualità del prodotto finale [1]. In questa direzione, il processo di Spray Freeze-Drying (SFD) si propone quale potenziale candidato come possibile metodo di essiccamento adattabile alla produzione continua [1].

Lo SFD sfrutta i vantaggi dello spray drying, che prevede l'atomizzazione di un liquido in particelle di piccola dimensione, e della liofilizzazione, permettendo l'ottenimento di una polvere essiccata dalle dimensioni controllate e dall'elevata stabilità [1]. Tuttavia, tale tecnica, non diversamente dalle altre metodologie di essiccazione applicabili, espone i biofarmaci a diverse fonti di stress che potrebbero causarne degradazione e/o denaturazione. Per questo motivo, considerando l'importante ruolo che lo spray freeze-drying può rivestire nella transizione dai processi di produzione batch a quelli continui nell'industria farmaceutica, è importante:

- comprendere quale delle fasi che compongono la tecnica SFD abbia il maggiore impatto sull'attività biologica del biofarmaco;
- valutare l'aggiunta di diversi eccipienti al principio attivo per poter identificare la formulazione più adatta alla preservazione della biomolecola di interesse e, dunque, della sua attività biologica.

1.1 Tecniche di essiccamento

La vita media di un biofarmaco in soluzione acquosa, a causa della loro insufficiente stabilità in ambiente liquido, non risulta particolarmente elevata. Le cause di ciò possono essere legate alla mobilità delle molecole in soluzione e alla capacità dell'acqua di favorire alcune vie di degradazione e denaturazione [20]. Dopo la fase di essiccamento, il biofarmaco è incorporato in una matrice solida le cui caratteristiche dipendono dal tipo di metodo di essiccazione, dai parametri di processo e dagli eccipienti che sono stati utilizzati per la formulazione.

Il prodotto anidro può essere ottenuto con diverse tecniche. Esse hanno come principale obiettivo l'allontanamento del solvente per aumentare la stabilità delle biomolecole, semplificarne la gestione e lo stoccaggio e ridurne i costi di trasporto [35]. La selezione della metodologia di essiccamento adeguata dipende da vari fattori, quali: proprietà fisiche del prodotto, destinazione finale del prodotto, fonti di energia disponibili, scalabilità dell'attrezzatura, costi delle materie prime, consumo energetico, qualità, durata di conservazione e caratteristiche dei prodotti essiccati [35]. I metodi di essiccamento principali si basano su diversi principi fisici: evaporazione come nello spray drying; sublimazione come nella liofilizzazione e nello spray freeze drying e precipitazione usando un fluido supercritico [11]. In ogni caso, qualunque sia il metodo scelto in base alle proprie esigenze, gli attributi critici di qualità che devono essere presi in considerazione per il prodotto finale sono:

- recupero dell'attività biologica: la differenza tra l'attività biologica che il prodotto presenta prima e dopo la fase di essiccazione. Durante l'essiccamento il biofarmaco va incontro a diversi tipi di stress. La quantità di attività biologica persa dipende dalla formulazione utilizzata per salvaguardarla e dalle condizioni operative selezionate per il processo;
- tempo di ricostituzione: è il tempo necessario per la ricostituzione del prodotto essiccato quando viene sciolto in acqua o in una soluzione salina. La ricostituzione deve essere rapida e completa;
- contenuto d'acqua residua: il contenuto d'acqua deve essere sufficientemente basso per evitare qualsiasi percorso di degradazione e/o denaturazione favorito dalla

presenza dell'acqua stessa. Tuttavia, si deve evitare un'eccessiva disidratazione del prodotto poiché anche in questo caso si potrebbe incentivare la denaturazione del biofarmaco;

- stabilità del prodotto: il prodotto deve conservare l'attività biologica necessaria al suo scopo nelle condizioni di stoccaggio e per tutto il tempo che intercorre tra la fine della produzione e la sua somministrazione;
- aspetto del prodotto essiccato: a seconda delle tecniche di essiccamento utilizzate, si ottiene un prodotto essiccato diverso, il quale, deve rispettare determinate caratteristiche riguardanti la sua estetica.

Nelle sezioni seguenti, la liofilizzazione, lo spray drying e lo spray freeze-drying, verranno descritti con maggiore dettaglio.

1.2 Liofilizzazione

La liofilizzazione è la tecnica di essiccamento più utilizzata nella produzione farmaceutica. Grazie ai bassi valori di temperatura e pressione che vengono impiegati durante il processo, è possibile utilizzarlo con successo con molecole termolabili e preservare le condizioni di sterilità richieste per la loro produzione. Mediante congelamento, sublimazione sottovuoto e desorbimento, l'acqua (o un qualsiasi altro solvente) viene ad essere allontanata dalla soluzione contenente il biofarmaco e alcuni eccipienti. Attraverso tale procedura si ottiene un prodotto anidro altamente poroso, con bassi valori di umidità residua (solitamente nell'intorno del 3-6 %) che per il suo aspetto prende il nome di cake. I vantaggi ottenuti dall'applicazione del freeze drying sono molteplici, tra di essi: un aumento della vita media del principio attivo farmaceutico, la semplificazione della gestione e del trasporto di quest'ultimo e l'ottenimento di un prodotto essiccato dall'elevata area superficiale che ne favorisce la ricostituzione in tempi brevi [25]. Tuttavia, è da considerare che il processo risulta lungo (può richiedere giorni o addirittura settimane) molto complesso, costoso e, inoltre, sottopone il biofarmaco a degli stress notevoli che ne riducono l'attività biologica [30, 19]. Tali aspetti negativi sono giustificati nel momento in cui la molecola non è sufficientemente stabile allo stato liquido (non rendendo possibile un suo stoccaggio e preservazione in soluzione), la sua stabilità termica rende la liofilizzazione l'unica scelta plausibile, l'alto valore aggiunto del prodotto essiccato è in grado di bilanciare le spese [33].

Il freeze-drying viene solitamente operato come ultima fase del processo di produzione ed anticipato da un'adeguata formulazione della soluzione su cui operare. Talvolta, può essere eseguito anche a metà della produzione se il principio attivo deve essere conservato e non utilizzato per un certo periodo.

Il processo di liofilizzazione è composto da tre fasi che sono di seguito riassunte.

- Congelamento: la temperatura del prodotto viene abbassata al di sotto del suo punto di congelamento e la maggior parte del solvente si congela formando cristalli di ghiaccio. Questa fase, a differenza delle altre due che completano il processo di liofilizzazione, è condotta a pressione atmosferica. Il congelamento ha notevole importanza, in quanto, la morfologia del prodotto congelato determina quella del prodotto liofilizzato.

- Essiccamento primario: dopo il completo congelamento del prodotto, la pressione nella camera è abbassata sotto il punto triplo del solvente dando inizio alla sublimazione. Tale cambiamento di fase è di natura endotermica, richiede energia, di conseguenza è necessario fornire calore al prodotto congelato in modo che il processo continui [12]. La temperatura nella camera di liofilizzazione solitamente impiegata in questa fase va, nella maggior parte dei casi, da $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ [25]. Durante l'essiccamento primario è importante mantenere la temperatura del prodotto congelato sotto un limite specifico per evitarne il collasso o la fusione. Tale valore limite risulta funzione della tipologia di formulazione impiegata.
- Essiccamento secondario: A causa del fatto che, nell'essiccamento primario, solo l'*acqua libera* (quella non legata alle molecole del prodotto) venga ad essere allontanata, in questa seconda fase di essiccamento è necessario rimuovere le molecole legate del solvente (*acqua legata*). Tale operazione risulta indispensabile per raggiungere la quantità di umidità residua desiderata nel prodotto liofilizzato. [12]. La temperatura in camera viene aumentata rispetto a quella utilizzata nella fase precedente per favorire il desorbimento dell'acqua [25]. Anche in questo caso è necessario che la temperatura del prodotto rimanga sotto un limite specifico per evitare effetti indesiderati. La pressione utilizzata è la stessa dell'essiccamento primario o, talvolta, inferiore.

Nella Figura 1.1 le fasi della liofilizzazione sono rappresentate con tre frecce rosse sul diagramma di stato dell'acqua.

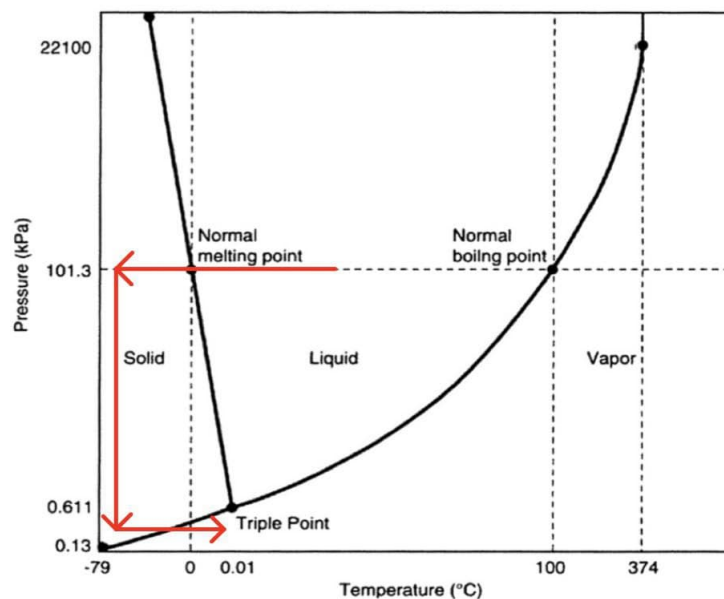


Figura 1.1: Diagramma di stato dell'acqua contenente gli fasi di liofilizzazione. Figura tratta da [14] con modifiche.

Le principali tipologie di liofilizzatore adottate sono: il liofilizzatore a collettore, il liofilizzatore rotatorio e il liofilizzatore a ripiani. Quest'ultimo è quello generalmente utilizzato per la liofilizzazione di soluzioni farmaceutiche. Uno schema tipico di un liofilizzatore a ripiani è mostrato nella Figura 1.2, esso risulta essere composto da:

- una camera di liofilizzazione: al suo interno sono contenuti i ripiani su cui si dispongono i flaconi presentanti il prodotto da liofilizzare. La regolazione della temperatura

è consentita dal passaggio di un fluido, generalmente olio silconico, all'interno dei ripiani stessi;

- un condensatore: il vapore acqueo prodotto durante le fasi di essiccamento condensa su una superficie raffreddata tra $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [13]. Questa azione riduce la portata volumetrica di gas diretta alla pompa a vuoto [25];
- una pompa a vuoto: usata per scaricare i gas incondensabili;
- una linea di alimentazione di gas (di solito azoto) in camera: adoperata per mantenere la pressione al valore stabilito.

Il condensatore e la pompa a vuoto, insieme, costituiscono l'unità di vuoto del liofilizzatore, utilizzata per creare il vuoto necessario durante gli essiccamenti primario e secondario. Solitamente questa unità è separata dalla camera di liofilizzazione per mezzo di una valvola. Essa viene tenuta chiusa durante il congelamento e aperta solo durante le fasi di essiccamento.

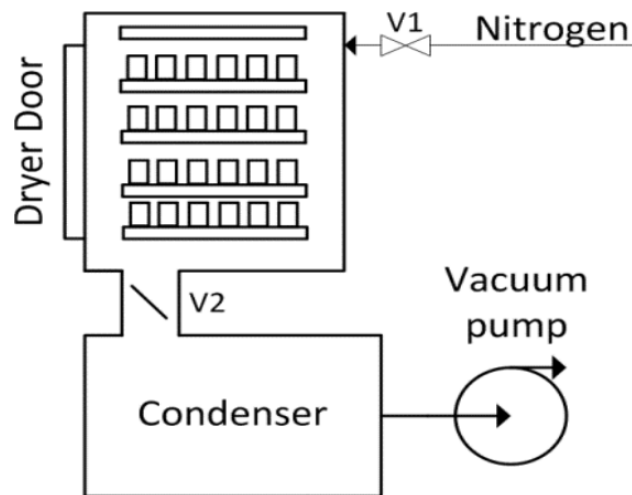


Figura 1.2: Schema tipico di un liofilizzatore con i suoi componenti principali. Figura tratta da [28].

1.2.1 Congelamento

Il congelamento è la prima fase del processo di liofilizzazione. Solitamente, esso viene effettuato a pressione atmosferica e prevede il raffreddamento delle formulazioni fino alla nucleazione dei cristalli di ghiaccio con una successiva loro crescita. In questa fase si ha la separazione della maggior parte dell'acqua sotto forma di ghiaccio da una matrice vetrosa o cristallina (a seconda degli eccipienti impiegati per la formulazione) [15]. Il congelamento, seppur della durata di poche ore, ha un impatto diretto sulla velocità di sublimazione nell'essiccamento primario e sulle proprietà del prodotto finale essiccato come il tempo di ricostituzione e l'attività biologica residua. La nucleazione e la crescita dei cristalli di ghiaccio, infatti, determinano la morfologia del prodotto congelato e di conseguenza del prodotto anidro finale [15].

Osservando la Figura 1.3 è possibile notare che quando l'acqua è raffreddata non congela spontaneamente al suo punto di equilibrio (A) ma la sua temperatura continua a

scendere e il liquido raggiunge uno stato di sottoraffreddamento. *”Il sottoraffreddamento è uno stato di non-equilibrio, meta-stabile, che è simile a un’energia di attivazione necessaria per il processo di nucleazione”* [15]. Nell’acqua liquida sottoraffreddata, a causa del moto Browniano che provoca una fluttuazione della densità, le molecole formano degli aggregati (nuclei) con una disposizione molecolare simile a quella dei cristalli di ghiaccio [15].

La formazione di nuclei è una trasformazione termodinamica per la quale è possibile valutare la variazione dell’energia libera. Quest’ultima è la somma di due contributi, l’energia libera associata alla formazione di una nuova interfaccia tra il cluster e il solvente (energia di interfaccia) e l’energia libera di massa, in Figura 1.4 energia libera di volume. La prima è causa di un contributo sfavorevole da un punto di vista termodinamico e porta ad un aumento dell’energia libera di Gibbs con una tendenza che va con il quadrato del raggio del cluster in formazione, assumendo che sia di forma sferica. L’energia libera di massa, invece, che è sempre negativa, è proporzionale al cubo del raggio del cluster e produce una diminuzione dell’energia libera. Nella Figura 1.4, su un diagramma che ha sull’asse y la variazione dell’energia libera e sull’asse x il raggio del cluster, è possibile osservare in rosso i due contributi precedentemente menzionati e in azzurro l’andamento dell’energia libera totale. Al massimo della curva, dove $\Delta G^* = 0$, è associato un raggio critico r^* . Gli aggregati con $r < r^*$ si rompono rapidamente perché il sistema può diminuire la sua energia libera attraverso la loro dissoluzione, mentre, quando $r > r^*$, la diminuzione dell’energia libera del sistema è legata alla crescita dei nuclei.

Gli aggregati stabili non si formano a 0 °C ma a un valore più basso. Tale fenomeno è legato al fatto che, al diminuire della temperatura, la dimensione del raggio critico diminuisce e, conseguentemente, è più facile avere nuclei stabili che possano crescere e avviare il cambiamento di fase. Sul diagramma in Figura 1.3, al punto B, c’è la formazione del primo nucleo stabile con una successiva rapida nucleazione di tutto il sistema. Questo fenomeno è esotermico e poiché non tutto il calore prodotto viene allontanato, c’è un rapido aumento della temperatura del sistema che raggiunge il valore di equilibrio (punto C). Da questo punto si ha la crescita dei cristalli di ghiaccio e il congelamento completo dell’acqua a temperatura costante. Anche questa fase è esotermica ed è necessario rimuovere il calore latente dal sistema altrimenti la transizione di fase finirebbe. La temperatura scende quando il congelamento è completato e il prodotto tende a raggiungere la temperatura del ripiano.

I parametri importanti del processo di congelamento sono il grado di sottoraffreddamento e la velocità di raffreddamento. Il grado di sottoraffreddamento è la differenza tra la temperatura di equilibrio e la temperatura di nucleazione (T_n). Questo parametro ha un impatto diretto sulla morfologia del prodotto congelato e di conseguenza sul prodotto essiccato. Minore è il valore di T_n , maggiormente favorevole è la formazione di nuclei di ghiaccio e più elevato è il numero di cluster stabili che si formano. Questi possono essere visti come germi di cristallizzazione e quindi il punto di partenza da cui si sviluppa un cristallo di ghiaccio. Considerando di dover congelare sempre la stessa quantità di acqua, maggiore è il grado di sottoraffreddamento raggiunto dal sistema, maggiore sarà la quantità di cluster stabili che vi si formeranno. Ad un alto grado di sottoraffreddamento corrisponderà, dunque, un grande numero di nuclei stabili. Al termine del congelamento, come conseguenza, si avrà un sistema contenente un elevato numero di cristalli di piccole dimensioni. Al contrario, ad un basso grado di sottoraffreddamento corrisponderà un basso numero di nuclei stabili e un sistema che, alla fine del processo, possiederà cristalli grandi ma in numero minore rispetto al primo caso. Anche la velocità di raffreddamento ha un impatto sulla morfologia del prodotto ed assume rilevanza a partire dal punto C

della Figura 1.3. Più alta è la velocità di raffreddamento meno tempo hanno i cristalli per crescere così, alla fine, il sistema presenterà un alto numero di cristalli ma con piccole dimensioni. Al contrario, impiegando una bassa velocità di raffreddamento, il campione alla fine del congelamento avrà cristalli più grandi ma in minor numero. I due parametri non hanno la stessa importanza; il grado di sottoraffreddamento ha un impatto maggiore tra i due. Tuttavia, mentre la velocità di raffreddamento è facile da gestire, la temperatura di nucleazione è un evento stocastico e, di conseguenza, la distribuzione delle dimensioni dei cristalli di ghiaccio può essere diversa da flacone a flacone [15].

Il controllo della T_n permette di agire sulla morfologia del prodotto congelato e, di conseguenza, sul grado di vuoto e sulla distribuzione dimensionale dei pori del prodotto essiccato. L'aspetto morfologico ha un impatto su:

- velocità di sublimazione: un numero elevato di pori di piccole dimensioni offrirà una maggiore resistenza all'uscita del vapore, abbassando la velocità di sublimazione. Di contro, pori grandi, in numero minore, favoriscono la fuoriuscita del vapore;
- tempo di ricostituzione;
- attività biologica residua: maggiore è la superficie esposta del prodotto essiccato (piccoli pori in gran numero) maggiore è la probabilità che la proteina, incapsulata nella matrice solida, sia esposta a interfacce solido-gas che possono condurla al deterioramento.

Sono state fatte diverse prove per cercare di controllare la temperatura di nucleazione. Le tecniche con una maggiore prospettiva di applicazione futura in ambito industriale sono qui solo menzionate: ice fog technique, ultrasounds technique, pressure shift method e vacuum induced surface freezing.

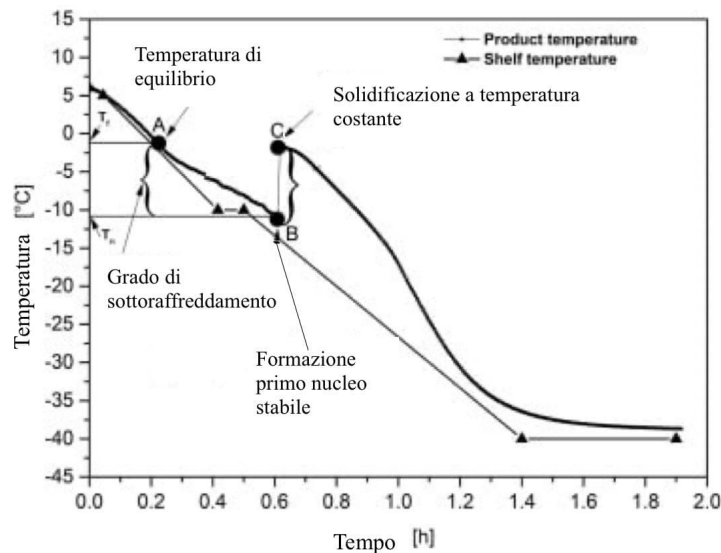


Figura 1.3: Esempio di un tipico profilo di temperatura durante il congelamento. Figura tratta da [4] con modifiche.

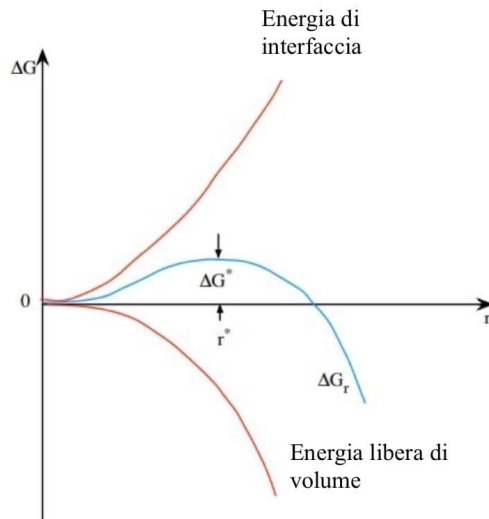


Figura 1.4: *Variazione dell'energia libera di Gibbs in funzione del raggio del cluster. Figura tratta da [39] con modifiche.*

1.2.2 Essiccamento primario

La fase di essiccamento primario è la più lunga e critica del processo di liofilizzazione, essa, infatti, contrariamente al congelamento e all'essiccamento secondario che possono richiedere ore, può durare addirittura giorni [15]. Al termine della fase di congelamento la pressione nella camera di liofilizzazione viene abbassata sotto il punto triplo dell'acqua al fine di favorire l'inizio del processo di sublimazione dei cristalli di ghiaccio.

Durante l'essiccamento il prodotto si trasforma in uno strato anidro poroso che ostacola la fuoriuscita del vapore. Al procedere della liofilizzazione lo spessore dello strato essiccato aumenta comportando un conseguente aumento della resistenza offerta al trasporto di materia e influenzando la velocità di sublimazione. La struttura dello strato essiccato è legata alla tipologia di eccipienti impiegati per la formulazione e al protocollo di congelamento adottato.

La velocità di essiccamento, oltre ad essere influenzata dalla morfologia dello strato essiccato, sarà condizionata dalla forza spingente al trasporto di materia. Quest'ultima è data dalla differenza tra la tensione di vapore del prodotto congelato (P_{ice}) e la pressione in camera (P_c). Affinché il processo possa proseguire è necessario che la P_c sia inferiore alla tensione di vapore del ghiaccio (legata alla temperatura del prodotto stesso). La pressione in camera ricade solitamente in un intervallo di valori compreso tra i 4 Pa e i 40 Pa [17]. Minore risulta essere la pressione nella camera di liofilizzazione maggiore sarà la forza spingente al trasferimento di materia. Tuttavia, pressioni eccessivamente basse ($P_c \leq 4$) possono creare problemi limitando la velocità di trasferimento di calore al prodotto [17].

Il processo di sublimazione è un processo endotermico che richiede calore per poter proseguire. La quantità di energia richiesta viene ad essere fornita fissando adeguatamente la temperatura della camera.

Il parametro che richiede una maggiore attenzione nella fase di essiccamento primario è la temperatura del prodotto. Durante la fase di sublimazione il prodotto dovrà essere mantenuto al di sotto della temperatura eutettica di fusione (T_{eu} , nel caso di formulazioni contenenti eccipienti che vanno incontro ad una cristallizzazione) o alla temperatura di

transizione vetrosa (T_g , nel caso di presenza di eccipienti che determinano la formazione di una fase amorfa) altrimenti potrebbe subire fenomeni di collasso o fusione.

Risulta determinante per l'ottimizzazione della fase di essiccamento la scelta dei parametri operativi quali: la pressione in camera e la temperatura dei ripiani. Una velocizzazione del processo di sublimazione, senza apportare danni al prodotto, ha risvolti economici importanti essendo questa la fase più lunga e dispendiosa dell'intero ciclo di liofilizzazione.

1.2.3 Essiccamento secondario

L'essiccamento secondario costituisce l'ultimo passo del processo di liofilizzazione. In questa fase il solvente intimamente legato al prodotto che non è cristallizzato e, di conseguenza, non è stato rimosso per sublimazione, viene ad essere allontanato per desorbimento. L'obiettivo dell'essiccamento secondario è quello di ridurre l'umidità residua del prodotto al fine di raggiungere delle condizioni ottimali per la sua stabilità [34]. Il processo è condotto impiegando una temperatura solitamente compresa in un intervallo tra i 20 °C e 40 °C. Essa è, dunque, generalmente più alta di quella impiegata nella fase di essiccamento primario [26] in modo da favorire il desorbimento. La pressione utilizzata in camera risulta essere pari a quella adoperata durante la sublimazione se non più bassa, tuttavia, non vi sono riferimenti in letteratura che evidenzino un vantaggio nell'impiego di tale condizione operativa [26].

Nel caso di un prodotto amorfo, è necessario considerare che essi sono dotati di una temperatura di transizione vetrosa (T_g) che assume un differente valore a seconda del contenuto d'acqua residua nel prodotto stesso. In particolare, essa è tanto minore quanto maggiore è il valore di umidità contenuta nella matrice solida. La T_g rappresenta un limite oltre il quale si passa da una struttura rigida ad una altamente viscosa. Il superamento di tale soglia, dunque, porta all'acquisizione di una certa mobilità della matrice amorfa che potrebbe collassare su se stessa. La temperatura di transizione vetrosa cresce esponenzialmente al diminuire della quantità di acqua contenuta nel prodotto. Di conseguenza, tale valore limite in questa fase, contrariamente al caso dell'essiccamento primario in cui è costante, risulta aumentare con il decorrere del processo avendo via via un contenuto di umidità residua sempre minore. Per tale motivo, durante l'essiccamento secondario, la temperatura in camera viene ad essere aumentata gradualmente in modo da restare sempre al di sotto del valore di soglia. Ad ogni modo, si deve evitare un essiccamento eccessivo del prodotto in quanto tale condizione può portare ad un accelerazione delle reazioni di degradazione [18].

La forza spingente del processo è legata alla differenza tra la concentrazione di acqua residua presente nel prodotto e la concentrazione corrispondente di equilibrio.

1.3 Spray drying

Lo Spray Drying (SD) è un processo di essiccamento continuo che si compone di tre fasi: atomizzazione, essiccamento delle gocce/formazione delle particelle solide e raccolta del prodotto solido. La soluzione liquida contenente la proteina d'interesse e degli opportuni eccipienti viene ad essere spruzzata all'interno di una camera di essiccamento dove, a contatto con un gas caldo (solitamente aria o azoto [20]) si ha l'evaporazione del solvente. A causa di ciò, la concentrazione del soluto aumenta fino ad un valore critico al quale si

ha la precipitazione di particelle solide (di natura cristallina o amorfa) raccolte per mezzo di un ciclone o di un filtro [20].

La fase di atomizzazione rompe l'alimentazione liquida in goccioline dall'elevato rapporto area superficiale su massa. L'energia minima richiesta all'apparecchiatura per far ciò è quella necessaria alla creazione di una nuova interfaccia gas-liquido [35]. Questa prima fase del processo ha un ruolo molto importante in quanto incide sulla dimensione delle particelle solide del prodotto finale. Quest'ultima, infatti, è direttamente legata alla grandezza delle gocce di liquido ottenute a seguito dell'atomizzazione. Ulteriori parametri che influenzano la dimensione delle particelle sono legati alle proprietà delle formulazioni adoperate quali: viscosità, densità e tensione superficiale [20].

La velocità di evaporazione è un parametro importante in quanto incide sulle caratteristiche delle particelle solide ottenute alla fine del processo [20]. Essa risulta essere influenzata: dalla temperatura iniziale del gas, dalla sua portata, la portata della soluzione alimentata al processo e dall'umidità relativa del gas caldo adoperato.

Il completamento del processo avviene con la separazione del prodotto solido dalla corrente adoperata per l'essiccamento. Tale operazione viene ad essere effettuata: sfruttando la differente densità tra gas e particelle nel caso in cui si usi un ciclone; per mezzo dell'impiego di un filtro che è attraversato dalla corrente gassosa di processo [35].

Lo spray drying sottopone le proteine a stress di natura termica, meccanica e un possibile adsorbimento all'interfaccia gas-liquido nel corso del processo di atomizzazione. Tra di essi, quest'ultimo, risulta il meccanismo preponderante di denaturazione e aggregazione proteica [20].

1.3.1 Principali tipologie di atomizzatori

La fase di atomizzazione, cruciale per l'ottenimento di particelle solide che abbiano le caratteristiche desiderate, può essere condotta attraverso l'impiego di atomizzatori diversi, le principali soluzioni di comune uso sono riassunte di seguito.

- Atomizzatore idraulico: il liquido viene spinto nell'atomizzatore ad elevati valori di pressione [32] e forzato ad attraversare un orifizio. A tal fine l'energia richiesta per il passaggio è ottenuta da una conversione della pressione in energia cinetica [1]. Questa tipologia di atomizzatore permette di ottenere un prodotto in polvere dall'elevata densità e delle particelle di grande dimensione [1]. Tuttavia, il dispositivo è soggetto a corrosione e le particelle ottenute risultano meno omogenee rispetto a quanto ottenibile con altri dispositivi [1]. L'atomizzatore idraulico è solitamente impiegato con fluidi con bassa viscosità [1, 38].
- Atomizzatore pneumatico: la rottura del liquido in goccioline di piccola dimensione avviene grazie all'azione distruttiva di un gas compresso dotato di una elevata velocità [16]. Gli sforzi tangenziali generati nella soluzione alimentata dal gas (solitamente aria) permettono la formazione delle gocce di liquido [1]. Questa tipologia di atomizzatore viene spesso indicata anche come ugello a due fluidi dato l'impiego di due correnti. Ne esistono configurazioni che permettono di alimentare due flussi indipendenti e, a seconda del numero di passaggi del gas, si parla di: ugello a tre fluidi (singolo canale di passaggio del gas) o ugello a quattro fluidi (doppio passaggio del gas) [1]. Esso risulta impiegabile con liquidi ad alta viscosità e permette di ottenere particelle con un diametro medio inferiore ai $50 \mu m$ [16]. Tuttavia, il grande consumo di gas compresso ne fa lievitare i costi operativi. Nel momento in

cui è impiegato in processi quali lo spray freeze-drying, il gradiente di temperatura causato dal gas influenza il tempo di congelamento delle gocce di soluzione [1].

- Atomizzatore ad ultrasuoni: si basa sulla conversione di un segnale elettrico ad elevata frequenza in energia meccanica che viene trasferita al liquido [1]. Le onde ultrasonore sono tipicamente causate dalla simultanea espansione e contrazione di due trasduttori piezoelettrici che ricevono un segnale elettrico [1]. Le vibrazioni da loro generate sono trasmesse alla punta dell'atomizzatore causando la formazione di onde capillari e cavitazione sulla superficie della soluzione alimentata e determinandone la rottura in fini gocce [32]. Questa tipologia di atomizzatore permette di ottenere particelle in un ampio intervallo di dimensioni e maggiormente uniformi se comparate a quelle ottenibili mediante le tecniche precedentemente descritte. Tuttavia, esso risulta impiegabile solo con soluzioni a bassa viscosità e fluidi Newtoniani [1].
- Generatore piezoelettrico di fluido a gocce: permette la produzione di gocce monodisperse. Questo strumento si basa sull'instabilità di Rayleigh-Plateau. Il liquido uscente da un orificio capillare è disgregato in gocce attraverso l'impiego di una vibrazione meccanica generata da degli oscillatori piezoceramici [1]. Attraverso questa tecnica è possibile avere un preciso controllo dei parametri delle particelle prodotte e della loro distribuzione dimensionale. Ciononostante, vi può essere una coalescenza delle gocce generate e, le rigide condizioni operative, possono avere un impatto negativo nel caso in cui questa soluzione sia usata con biofarmaci [1].

1.4 Spray Freeze-Drying

Lo spray freeze-drying (SFD) è una tecnica di essiccamento che si propone come alternativa ai più classici processi usualmente impiegati. Essa sfrutta i vantaggi dello spray drying e della liofilizzazione permettendo l'ottenimento di una polvere essiccata dalle dimensioni controllate e dall'elevata stabilità [1]. Lo SFD, infatti, è un metodo adatto a prodotti termolabili e si compone di tre fasi: atomizzazione, congelamento ed essiccamento.

La prima fase del processo, comune allo SD, prevede la rottura della soluzione alimentata in gocce di piccola dimensione per mezzo di un opportuno atomizzatore. L'atomizzazione incide sulla velocità di essiccamento e sulla distribuzione dimensionale del prodotto solido che si ottiene alla fine del processo [1]. La scelta di un atomizzatore adeguato risulta fondamentale al fine di ottenere le caratteristiche desiderate per la polvere essiccata. Le tipologie di ugelli impiegabili sono le stesse precedentemente descritte in § 1.3.1.

Il congelamento, estremamente rapido, è condotto mediante l'uso di un fluido criogenico, solitamente azoto liquido o aeriforme [1]. Il cambiamento di fase, come descritto in § 1.2.1, comprende differenti passaggi: il sottoraffreddamento al di sotto della temperatura di equilibrio del solvente, la nucleazione, la crescita dei cristalli di ghiaccio a temperatura costante e, a seguito del completo di quest'ultima, il raffreddamento delle particelle congelate alla temperatura del fluido criogenico [14]. Questa seconda fase dello spray freeze-drying, come nel processo di liofilizzazione, incide sulla morfologia del prodotto essiccato, dunque, sulla dimensione e il numero dei pori che le particelle solide presenteranno alla fine del processo.

Le configurazioni adoperabili per la fase di spray freezing risultano essere differenti e possono essere classificate come riassunto di seguito.

- Spray Freezing into Vapor (SFV): l'atomizzazione viene ad essere condotta in una camera contenente un fluido criogenico in fase vapore. Il contatto delle gocce di liquido con esso ne permette il congelamento.
- Spray Freezing into Liquid (SFL): l'atomizzatore viene ad essere posizionato al di sotto della superficie del liquido criogenico. Il congelamento delle particelle avviene in maniera istantanea a seguito della loro formazione [14]. Il fluido criogenico è opportunamente miscelato al fine di evitare una agglomerazione delle particelle [1, 14]. Il congelamento estremamente rapido permette di minimizzare i possibili effetti negativi di denaturazione proteica legati a variazioni di pH, separazione di fase e crescita dei cristalli. Inoltre, si favorisce la formazione di una matrice contenente la molecola d'interesse di natura amorfa [1, 14]. Tuttavia, una velocità di congelamento così elevata porta alla formazione di una grande interfaccia liquido-ghiaccio che può promuovere la denaturazione proteica [1].
- Spray Freezing into Vapor over Liquid (SFV/L): la soluzione alimentata viene atomizzata attraverso un ugello posizionato poco al di sopra del liquido criogenico in ebollizione. Le gocce formatesi iniziano a solidificarsi durante l'attraversamento del vapore criogenico per poi completare il loro congelamento nel momento in cui giungono a contatto con la fase liquida dello stesso [1, 14]. In fine, le particelle congelate sono raccolte mediante setacciatura oppure soltanto dopo la completa evaporazione del liquido criogenico per essere trasferite in un liofilizzatore per la fase di essiccamento [1]. Lo SFV/L risulta la metodologia maggiormente applicata in ambito farmaceutico [1].

La fase di essiccamento è solitamente svolta in maniera convenzionale in condizioni di vuoto, come descritto in § 1.2.2 e 1.2.3. Tuttavia, è stata valutata anche la possibilità di condurre il processo a pressione atmosferica o sub-atmosferica [1, 14].

1.4.1 Potenziali applicazioni in una produzione in continuo dello SFD

La produzione farmaceutica si compone di processi di tipo batch e le tecniche di essiccamento precedentemente discusse sono state sviluppate su tale base. Tuttavia, sussiste la volontà di evolvere verso una forma di produzione in continuo. Un impiego di tale forma di produzione, infatti, permetterebbe di ottenere dei vantaggi di natura economica, in relazione alla produttività (permettendo di rispondere in maniera più agevole alla domanda di mercato) e alla qualità del prodotto ottenuto [9]. Un processo di produzione continua, in aggiunta, se comparato ad uno di tipo batch, risulta più sicuro (data la minore esposizione degli operatori al materiale processato) e comporta una riduzione dei tempi di produzione (eliminando gli intervalli temporali che intercorrono tra due fasi consecutive di una produzione discontinua) [9].

Nell'ambito della produzione farmaceutica, lo spray freeze-drying si propone come potenziale tecnica di essiccamento adattabile alla produzione continua [1]. Seppur esso non abbia ancora un effettivo implemento su scala industriale, sono stati operati differenti tentativi che pongono le basi per una sua possibile applicazione futura in tale ambito.

L'approccio che maggiormente si avvicina alle prove operate in laboratorio per questo lavoro di tesi è la tecnologia sviluppata dalla Meridion Technologies. La tecnica prevede l'impiego di una camera di spray freezing collegata ad un tamburo rotante (Figura 1.5).

Nella sezione di spray freezing il liquido alimentato viene ad essere suddiviso in gocce di piccola dimensione mediante l'impiego di un ugello. Il congelamento delle goccioline avviene durante l'attraversamento della camera cilindrica raffreddata usando azoto liquido e/o aeriforme. Successivamente, il prodotto congelato è scaricato in maniera continua nel tamburo rotante, opportunamente pre-raffreddato, al fine di operarne l'essiccamento. Tale fase avviene mediante una miscelazione delicata del prodotto ed è condotta sottovuoto. L'energia di sublimazione viene ad essere fornita da delle sorgenti radianti e dalle superfici a temperatura controllata del tamburo. Il prodotto ottenuto a seguito dell'essiccamento è raccolto in un apposito contenitore.

Questa tecnologia può potenzialmente essere convertita in un processo continuo nel momento in cui venga ad essere progettato un sistema in continuo per lo scarico del prodotto essiccato o, in alternativa, nel caso in cui sia possibile collegare la camera di spray freezing a più tamburi rotanti operanti in parallelo [1].

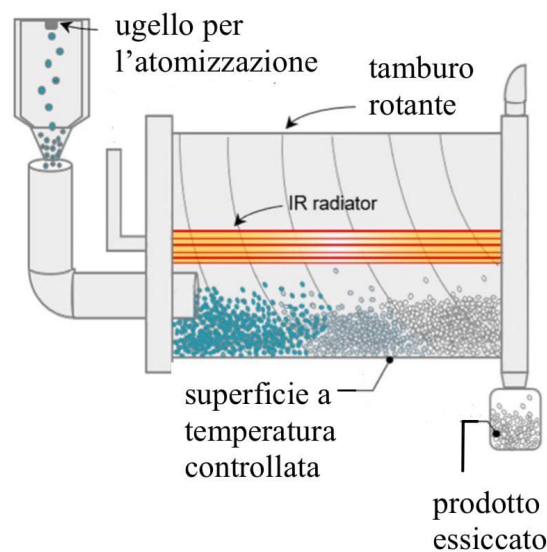


Figura 1.5: Rappresentazione schematica di un processo di spray freeze drying dinamico con una rimozione in continuo del prodotto liofilizzato. Figura tratta da [1] con modifiche.

1.5 Stabilità proteica e formulazione

Nei processi di produzione farmaceutica, prima che un biofarmaco sia sottoposto al processo di allontanamento del solvente, viene ad essere effettuata una fase di formulazione della soluzione da processare. L'aggiunta di opportuni eccipienti ha lo scopo di preservare le caratteristiche della molecola di interesse nel corso della lavorazione.

I biofarmaci, prevalentemente di natura proteica, sono macromolecole molto sensibili che, sottoposte a stress, possono andare incontro a differenti processi che possono causarne la perdita dell'attività biologica. Questi ultimi possono essere distinti in due categorie: degradazione e denaturazione. Nel primo caso si verifica una modifica dei legami covalenti caratterizzanti la molecola con una conseguente variazione della sua struttura primaria. Nel secondo caso, invece, la proteina non subisce alcuna alterazione di natura chimica ma va incontro ad una variazione della sua conformazione spaziale.

La denaturazione, come enunciato, comporta una perdita della struttura tridimensionale della proteina. Come conseguenza, i suoi gruppi idrofobi, generalmente rivolti

verso l'interno nel ripiegamento nativo, vengono esposti verso l'esterno (unfolding). La potenziale interazione tra proteine denaturate può portarne all'aggregazione che impatta negativamente sull'attività biologica. Questo processo è irreversibile, al contrario della sola denaturazione, la quale, invece, è reversibile in quanto la proteina potrebbe acquisire nuovamente la sua struttura nativa ripiegandosi.

1.5.1 Potenziali fonti di perdita di attività biologica nello SFD

Lo spray freeze-drying, come tutti i processi di essiccamento, nonostante sia svolto al fine di garantire la preservazione della proteina nel tempo, sottopone quest'ultima ad un elevato numero di stress che ne comportano la perdita dell'attività biologica.

Durante la fase di atomizzazione la molecola processata è sottoposta a degli stress di taglio ed è esposta ad una elevata interfaccia gas-liquido. In generale, gli stress di natura meccanica da soli non causerebbero problemi di instabilità importanti ma, in combinazione con il possibile adsorbimento all'interfaccia aria-acqua della proteina, possono portare al verificarsi di significativi fenomeni di aggregazione [20]. A seguito dell'adsorbimento, infatti, le proteine possono subire mutamenti nella loro conformazione esponendo i residui idrofobici all'interfaccia aria-acqua al fine di minimizzarne la visibilità al solvente. L'interazione tra gruppi idrofobici di proteine denaturate può potenzialmente portare alla formazione di aggregati e, in alcuni casi, alla formazione di precipitati [20].

Le fasi di congelamento ed essiccamento gravano fortemente sull'attività biologica residua della proteina. I meccanismi che preponderantemente possono comportare denaturazione e possibile aggregazione sono riportati in maniera sintetica di seguito.

- Denaturazione a freddo: le proteine possono essere suscettibili ad uno spontaneo unfolding alle basse temperature [29]. Al diminuire della temperatura l'interazione dei gruppi idrofobici, rilegati all'interno della proteina, con le molecole d'acqua polari esterne, non risulta essere più fortemente sfavorita. Dal punto di vista termodinamico ciò può essere giustificato da un andamento parabolico dell'energia libera di Gibbs di unfolding [29]. Osservando la Figura 1.6 è infatti possibile notare come al di sotto di un valore critico di temperatura (T_c) il $\Delta G_{unfolding}$ divenga nuovamente negativo favorendo la perdita della struttura nativa della proteina [29].

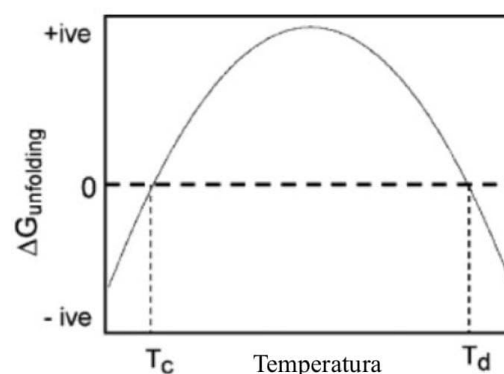


Figura 1.6: Andamento del $\Delta G_{unfolding}$ in funzione della temperatura. Figura tratta da [29] con modifiche.

- Cristallizzazione del soluto: L'avanzamento del fronte di congelamento porta ad un aumento della concentrazione del soluto nella fase liquida rimanente. Tale effetto

può indurre cambiamenti nella struttura delle proteine e favorire la possibilità di collisioni tra le molecole. In conseguenza di ciò potrebbero verificarsi fenomeni di aggregazione e possibile formazione di precipitati [29].

- Variazioni di pH: Durante il congelamento potrebbe verificarsi un cambiamento nel pH della soluzione a causa di una precipitazione selettiva di alcuni componenti del buffer. Tale mutazione può essere causa di una destabilizzazione della proteina [29].
- Formazione di interfaccia acqua-ghiaccio: il congelamento porta alla formazione di un'interfaccia acqua-ghiaccio alla quale le proteine possono adsorbirsi con una conseguenza perdita dell'attività biologica.
- Cristallizzazione del soluto: Eccipienti come il mannitolo, glicina ecc..., in caso di congelamento lento, raggiunto uno stato di sovrasaturazione, possono cristallizzare. Questo fenomeno impone uno stress addizionale in quanto promuove la formazione di un'interfaccia aggiuntiva sulla quale le proteine possono adsorbirsi e denaturarsi. Tuttavia, la presenza di soluti cristallini permette di condurre l'essiccamento a temperature maggiori in quanto presentano temperature di collasso nettamente superiori a quelle dei soluti amorfi.
- Separazione di fase: Durante il congelamento possono formarsi due o più fasi amorfe per formulazioni contenenti elettroliti, polimeri, polisaccaridi, tensioattivi o proteine [5]. La proteina potrebbe ripartirsi tra le diverse fasi e di conseguenza ritrovarsi in assenza di crioprotettori o stabilizzanti.
- Disidratazione: la proteina in soluzione acquosa si trova completamente idratata. Nel momento in cui, nelle fasi di essiccamento il solvente viene ad essere allontanato, si può avere la perdita di legami idrogeno fondamentali per la configurazione spaziale della molecola con una conseguente denaturazione proteica.

L'elevata velocità con cui si effettua il congelamento nello spray freeze-drying permette di minimizzare effetti di variazione di pH, formazione di grandi cristalli, separazione di fase e sfavorisce la cristallizzazione di soluti che, in caso di congelamento lento, porterebbero alla formazione di una fase cristallina. D'altro canto, essa comporta la formazione di un elevato numero di cristalli di ghiaccio di piccola dimensione, per cui, un'elevata superficie di interfaccia acqua-ghiaccio su cui le proteine possono adsorbirsi [1].

1.5.2 Meccanismi di protezione proteica

Al fine di inibire o mitigare i meccanismi che possono causare una perdita dell'attività biologica di proteine precedentemente descritti è possibile impiegare un'ampia gamma di eccipienti.

L'utilizzo di tensioattivi permette di inibire gli effetti negativi generati dalle interfacce sulle quali le proteine possono adsorbirsi nel corso del processo. In genere, essi sono composti anfifilici che hanno la capacità di disporsi all'interfaccia tra due fasi andando in questo modo ad eliminare o per lo meno inibire tale tipologia di stress. Tra i tensioattivi maggiormente impiegati risulta esservi il Tween 80.

Zuccheri e polioli risultano essere ottimi crioprotettori e lioprotettori. La capacità protettiva di quest'ultimi è legata alla loro concentrazione in soluzione, infatti, è necessario raggiungerne un valore minimo al fine di avere un effetto protettivo che sia rilevante [2].

Gli stabilizzanti più efficaci sono i disaccaridi [37], tra loro, quelli maggiormente impiegati risultano essere il saccarosio ed il trealosio poichè dotati di temperature di transizione vetrosa relativamente elevate.

I polimeri hanno la capacità di limitare le interazioni proteina-proteina grazie all'ingombro sterico da loro creato e/o l'aumento di viscosità della soluzione [37]. Sono inoltre in grado di esprimere fenomeni di esclusione preferenziale, attività di superficie ed incrementare la temperatura di transizione vetrosa della soluzione in cui sono contenuti [37]. Tuttavia, essi possono avere un effetto deleterio favorendo la separazione di fase [37].

I meccanismi di protezione proteica solitamente espliciti dagli eccipienti su citati durante le fasi di congelamento ed essiccamento vengono ad essere qui riportati:

- **Esclusione preferenziale:** alcuni eccipienti sono esclusi preferenzialmente dalla superficie proteica favorendo l'interazione delle molecole d'acqua con la proteina. Tale condizione porta ad una situazione termodinamicamente sfavorita. La denaturazione della proteina comporterebbe un aumento della sua superficie esposta al solvente e, di conseguenza, un aumento dell'energia libera di Gibbs rispetto a quella posseduta dalla molecola allo stato nativo. Il processo di denaturazione risulta, dunque, termodinamicamente sfavorito.
- **Water replacement:** Durante l'essiccamento alcuni eccipienti sono in grado di sostituirsi all'acqua nella formazione di legami idrogeno con i residui amminoacidici esposti dalla proteina. Se ciò non avvenisse, quest'ultima tenderebbe a riarrangiarsi perdendo la propria conformazione spaziale ed esponendo la parte idrofoba con una conseguente possibile aggregazione.
- **Water entrapment:** questo meccanismo risulta essere espresso dagli eccipienti prevalentemente durante l'essiccamento. Alcuni di essi sono in grado di formare una gabbia attorno alla superficie della proteina. Le molecole d'acqua che si troveranno internamente a tale gabbia presentano una diffusività molto minore rispetto a quelle presenti esternamente. Diminuendo la mobilità di tale molecole si riduce anche la mobilità della proteina stessa.
- **Vetrificazione:** secondo la teoria della vetrificazione la stabilità della proteina è ottenuta a seguito della sua diluizione in un rigido ed inerte solido vetroso [7]. L'aggiunta di eccipienti diluisce la soluzione e ne aumenta la viscosità. La diluizione tende ad allontanare le proteine mentre una viscosità maggiore ne riduce il movimento. In questo modo i processi di denaturazione proteica, favoriti dalla presenza di mobilità molecolare, vengono ad essere almeno in parte inibiti.

1.6 Obiettivo della tesi

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di osservare l'impatto delle tre fasi dello spray freeze-drying (atomizzazione, congelamento ed essiccamento) sull'attività biologica di una proteina modello. Le prove sono state condotte attraverso l'impiego di soluzioni contenenti diversi eccipienti al fine di evidenziare come un'opportuna formulazione risulti necessaria per la conservazione dell'attività biologica. La necessità di analizzare i risultati con un'elevata sensibilità ha spinto, inoltre, alla realizzazione di un protocollo di analisi basato sulla capacità della proteina modello adoperata, la mioglobina, di catalizzare la reazione di ossidazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) in presenza di perossido di idrogeno.

Capitolo 2

Materiali e metodi sperimentali

In questo capitolo si illustreranno i materiali, i protocolli e gli strumenti impiegati per l'ottenimento dei risultati espliciti nel Capitolo 3. Gli esperimenti sono stati condotti presso i laboratori di liofilizzazione del gruppo di ricerca Molecular Engineering Laboratory, Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT), del Politecnico di Torino. La Mioglobina (Mb) estratta da cuore di cavallo (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stata selezionata come proteina modello per la conduzione delle prove sperimentali. Tale proteina è caratterizzata da un peso molecolare di 16700 kDa ed è costituita da una singola catena polipeptidica avvolta a formare otto α -eliche. La presenza del cofattore eme al suo interno ne rende possibile l'attività catalitica.

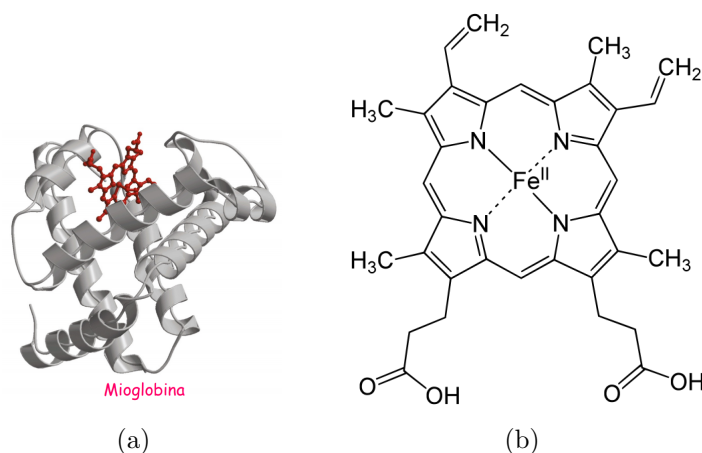


Figura 2.1: (a) Struttura tridimensionale della Mioglobina (Mb). (b) Gruppo eme presente nella mioglobina che ne rende possibile l'attività catalitica nei confronti dell'ABTS in presenza di perossido di idrogeno.

2.1 Elaborazione del saggio ABTS

La mioglobina catalizza l'ossidazione dell'acido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS), in presenza di perossido di idrogeno [6, 8]. Tale reazione porta alla formazione di un radicale cationico ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) che, in base alla sua concentrazione in soluzione, ne determina una colorazione che varia da un verde chiaro ad uno fortemente scuro (Figura 2.2).

L'abilità della mioglobina di comportarsi da pseudo-perossidasi in presenza di H_2O_2 [6], è legata al cofattore eme presente nella sua struttura (Figura(2.1)) [8]. Tale capacità può essere sfruttata per analizzare la sua attività biologica residua a seguito di ognuna delle fasi dello spray freeze-drying. La presente metodologia di analisi è stata elaborata in itinere per sopperire all'incapacità di ottenere risultati utili attraverso l'approccio inizialmente impiegato. In un primo momento, infatti, la procedura prevedeva la centrifugazione per 5 minuti, a 13000 rpm, dei campioni recuperati a seguito di ogni passo dello SFD e, seguentemente, il ricavo dei valori di assorbanza alle lunghezze d'onda di 280 nm e 410 nm.

Lo sviluppo del protocollo si è basato su un approccio di tentativi ed errori, con un costante confronto con quanto già presente in letteratura.

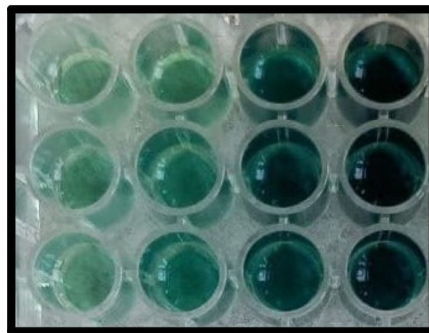


Figura 2.2: *Differenti colorazioni delle soluzioni contenenti $ABTS^+$, da sinistra a destra, concentrazione crescente.*

2.1.1 Individuazione della lunghezza d'onda ottimale

Il primo passo nell'elaborazione del protocollo per l'analisi dei risultati è stato quello di individuare la lunghezza d'onda ottimale da associare alla forma ossidata dell'ABTS. La soluzione stock dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) 30 mM, è stata preparata disciogliendo tale sostanza, presente in laboratorio sotto forma di sale di ammonio (Sigma Aldrich, Milano, Italia), in buffer citrato 10 mM a pH 3.7. Tale valore di pH inizialmente adoperato, era stato scelto sulla base delle caratteristiche della mioglobina, instabile a pH acidi, e del primo protocollo di analisi dei risultati considerato [3]. La soluzione di partenza di perossido di idrogeno (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stata ottenuta diluendo quest'ultimo in acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kabi, Verona, Italia) al fine di raggiungere una concentrazione iniziale di 40 mM. A partire da queste due soluzioni stock sono stati ottenuti quattro campioni le cui caratteristiche sono riassunte nella Tabella 2.1.

Le soluzioni 1 e 3 sono state ottenute mediante un'opportuna diluizione della soluzione di ABTS con buffer citrato. Le soluzioni 2 e 4, invece, da una adeguata combinazione delle soluzioni iniziali dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) e dell' H_2O_2 . Disposto 1 ml di ognuno di esse in delle cuvette (BRAND GMBH + CO KG, Wrtheim, Germania), ne è stato osservato lo spettro di assorbanza in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 300 nm e 900 nm. Tale operazione è stata condotta attraverso l'uso di uno spettrofotometro UV/visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Seguendo questa procedura è stato possibile individuare una lunghezza d'onda da associare al radicale cationico $ABTS^{\cdot+}$, 420 nm, come sarà eviden-

ziato in § 3.1.1. Questo valore è stato impiegato per tutte le analisi spettrofotometriche successivamente svolte.

Tabella 2.1: *Soluzione su cui è stata condotta l'analisi spettrofotometrica al fine di individuare la lunghezza d'onda a cui fosse possibile associare la forma ossidata dell'ABTS.*

Soluzione	ABTS [mM]	H ₂ O ₂ [mM]
1	12.5	-
2	12.5	30
3	3.125	-
4	3.125	37.5

2.1.2 Influenza del pH sulla progressione della reazione di ossidazione

Il pH inizialmente adottato per il buffer citrato, pari a 3.7, era stato fissato al fine di destabilizzare la proteina modello in esame, essendo nota la sua instabilità a valori di pH acido [3]. Tuttavia, a seguito di un'analisi della letteratura [10, 36], si è deciso di studiare come un pH superiore a 3.7 potesse incidere sulla reazione di ossidazione dell'ABTS. Arbitrariamente si è optato di adottare, per la presente analisi e per le successive, una concentrazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) in soluzione pari a 10 mM e, in accordo con quanto osservato in studi già condotti [36], una concentrazione di H₂O₂ pari alla metà, ossia, 5 mM. Mediante l'uso di buffer citrato 10 mM a valori di pH pari a: 6.5, 7 ed 8, sono state preparate 3 differenti soluzioni per ognuna delle condizioni considerate: una contenete solo ABTS e perossido di idrogeno (alle concentrazioni precedentemente indicate), una seconda che in aggiunta alla prima presentava una quantità di mioglobina pari a $0.05 \frac{mg}{ml}$ ed una terza che si differenziava dalla precedente per l'essere caratterizzata da una concentrazione della proteina modello pari a $0.1 \frac{mg}{ml}$.

Per ognuna delle soluzioni presenti nella Tabella 2.2 sono state prelevate tre aliquote da 150 μl e disposte in altrettanti corrispondenti pozzetti di un piastra multiwell (Greiner Bio-one, Cassina de' Pecchi (MI), Italia). Attraverso l'uso di uno spettrofotometro UV/visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), si è andati a monitorare l'andamento dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 420 nm, programmando lo strumento in modo che ne leggesse il valore ogni minuto per un tempo complessivo di 30 minuti. La temperatura per il decorso della reazione è stata fissata, in accordo con quanto ritrovato in letteratura [36], ad un valore di 25 °C. In § 3.1.2, si mostrano le ragioni che hanno portato alla scelta di un pH di 6.5 come valore ottimale.

Tabella 2.2: Riassunto delle caratteristiche delle soluzioni impiegate al fine di osservare l'effetto di differenti valori di pH sul decorso della reazione di ossidazione dell'ABTS.

pH del buffer citrato 10 mM	ABTS mM	H ₂ O ₂ mM	Mb $\frac{mg}{ml}$
6.5	10	5	-
	10	5	0.05
	10	5	0.01
7	10	5	-
	10	5	0.05
	10	5	0.01
8	10	5	-
	10	5	0.05
	10	5	0.01

2.1.3 Influenza della concentrazione di mioglobina sull'andamento della reazione di ossidazione

Selezionato il pH ottimale da impiegare nel saggio per l'analisi dei risultati, si è andati ad osservare come la concentrazione di mioglobina incidesse sul progredire della reazione di ossidazione. Attraverso tale studio è stata individuata la concentrazione della proteina assunta come riferimento per le successive analisi. Sono state dunque preparate 16 differenti soluzioni mediante l'uso di buffer citrato 10 mM a pH 6.5, con concentrazioni di ABTS ed H₂O₂ rispettivamente eguali a 10 mM e 5 mM ma presentanti differenti quantità di mioglobina. Le prime otto erano caratterizzate da una concentrazione della proteina contenuta nell'intervallo [10-200] $\frac{ng}{ml}$, le altre in un intervallo [0.05-15] $\frac{\mu g}{ml}$. Nella Tabella 2.3 sono mostrate in dettaglio le concentrazioni valutate all'interno dei due differenti intervalli di indagine.

Per le analisi, ogni soluzione è stata suddivisa in tre aliquote di 150 μl . Queste sono state disposte nei pozzetti di una piastra multiwell (Greiner Bio-one, Cassina de' Pecchi (MI), Italia) al fine di essere analizzate attraverso l'impiego di uno spettrofotometro UV/-visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Si è dunque seguito l'andamento dell'assorbanza a 420 nm, per un tempo di 30 minuti, con una cadenza di lettura di tale valore ad intervalli di un minuto. La temperatura è stata fissata a 25 °C e mantenuta costante per tutto il decorso dell'operazione.

Tabella 2.3: Valori di concentrazione di mioglobina negli intervalli $[10-200] \frac{ng}{ml}$ e $[0.05-15] \frac{\mu g}{ml}$ impiegate al fine di osservare l'influenza di tale parametro sul decorso della reazione di ossidazione dell'ABTS.

Intervallo di riferimento	Valori di concentrazione valutati
10-200 $\frac{ng}{ml}$	10
	20
	40
	60
	80
	100
	150
	200
0.05-15 $\frac{\mu g}{ml}$	0.05
	1
	2
	4
	5
	8
	10
	15

2.2 Esecuzione dello Spay Freeze-Drying

Successivamente alla messa appunto del saggio ABTS, utile all'analisi dei risultati secondo il protocollo descritto in § 2.3, si è passati ad operare le differenti fasi dello spray freeze-drying. L'impatto che esse hanno sull'attività biologica della proteina modello è stato valutato impiegando sia delle soluzioni di mioglobina in assenza di eccipienti, sia in presenza di quest'ultimi. In questo modo è stato possibile osservarne le capacità protettive nei confronti degli stress introdotti dalle differenti fasi della tecnica analizzata.

2.2.1 Caratteristiche delle formulazioni analizzate nelle fasi dello SFD

Le formulazioni studiate nelle fasi di atomizzazione, congelamento/scongelo ed essiccazione, sono soluzioni di mioglobina (da cuore di cavallo, Sigma Aldrich, Milano, Italia) in concentrazione pari a $5 \frac{\mu g}{ml}$, disciolta in buffer citrato 10 mM a pH 6.5 e in presenza di saccarosio, mannitolo e trealosio, al 5% in peso, con e senza tensioattivo Tween 80 (Sigma Aldrich, Milano, Italia), allo 0.01 % in peso. Nella Tabella 2.4 sono mostrate

tutte le alternative valutate. Attraverso un loro studio, ci si è posti l'obiettivo di indagare l'impatto dello SFD sull'attività biologica della proteina modello e il ruolo degli eccipienti e del tensioattivo nel prevenirne una riduzione.

Tabella 2.4: *Formulazioni impiegate per le prove di atomizzazione, congelamento/scongelamento ed essiccamento.*

Nome	Formulazione
Mb	Mioglobina nel solo buffer citrato
S	Saccarosio 5% in peso
M	Mannitolo 5% in peso
T	Trealosio 5% in peso
SM	Saccarosio 2.5 % in peso + Mannitolo 2.5 % in peso
ST	Saccarosio 2.5 % in peso + Trealosio 2.5 % in peso
MT	Mannitolo 2.5 % in peso + Trealosio 2.5 % in peso
Mb80	Mioglobina nel solo buffer citrato + Tween 80 0.01 % in peso
S80	Saccarosio 5% in peso + Tween 80 0.01 % in peso
M80	Mannitolo 5% in peso + Tween 80 0.01 % in peso
T80	Trealosio 5% in peso + Tween 80 0.01 % in peso
SM80	Saccarosio 2.5 % in peso + Mannitolo 2.5 % in peso + Tween 80 0.01 %
ST80	Saccarosio 2.5 % in peso + Trealosio 2.5 % in peso + Tween 80 0.01 %
MT80	Mannitolo 2.5 % in peso + Trealosio 2.5 % in peso + Tween 80 0.01 %

2.2.2 Atomizzazione

L'operazione di atomizzazione è stata eseguita per mezzo di un atomizzatore ad ultrasuoni (Büchi Labortechnik AG, Switzerland), descritto in § 1.3.1, per il quale si è fissata una potenza di esecuzione pari a 3 W. Caricate le formulazioni (indicate in § 2.2.1) in siringhe con volume pari a 10 ml e diametro di 15 mm, attraverso l'uso di una pompa a siringa (2 Biological Instruments, Besozzo (VA), Italia), le si è alimentate, una dopo l'altra, all'atomizzatore. Le siringhe sono state collegate a quest'ultimo per mezzo di un tubo capillare in silicone. Per ogni formulazione si è atomizzato un volume pari a 2 ml impiegando una portata volumetrica di $5 \frac{ml}{min}$. La quantità atomizzata è stata raccolta in flaconi 10R (45x24 mm, Nuova Ompi-Glass Division, Stevanato Group, Piombino Dese (PD), Italia) successivamente tappati con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia).

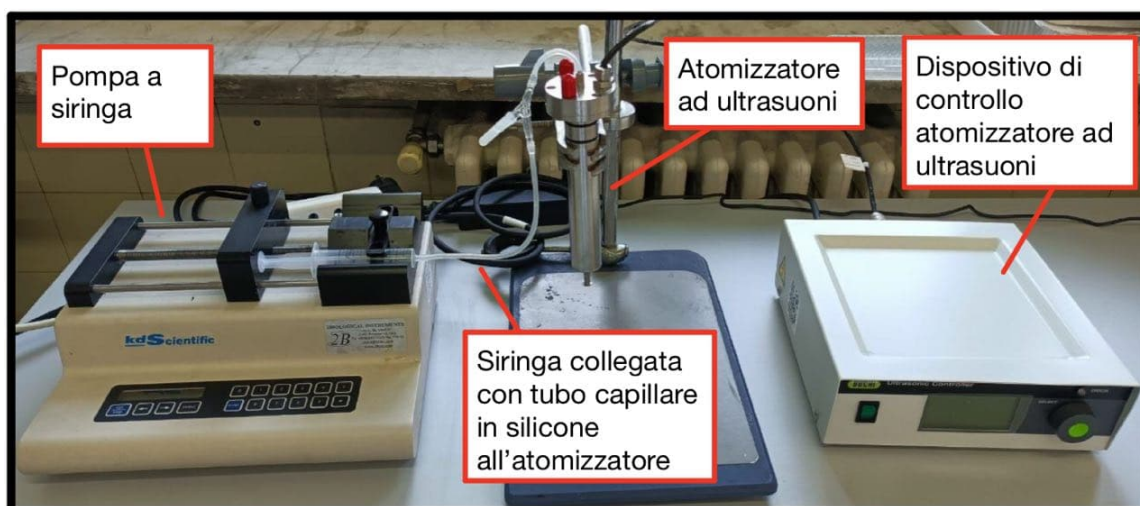


Figura 2.3: Fotografia che mostra gli strumenti adoperati per l'esecuzione delle prove di spray freezing

2.2.3 Congelamento/scongelamento

La fase di congelamento è stata condotta mediante la tecnica dello spray freezing into Vapour over Liquid (SFV/L), di cui si è parlato in § 1.4. Per ognuna delle formulazioni, indicate in § 2.2.1, sono stati congelati (e successivamente scongelati) 2 ml di soluzione. Tale quantità è stata alimentata all'atomizzatore ad ultrasuoni (Büchi Labortechnik AG, Switzerland), operante ad una potenza di 3 W, per mezzo di una pompa a siringa (2 Biological Instruments, Besozzo (VA), Italia). Le siringhe adoperate per le formulazioni (aventi le stesse dimensioni indicate nella sezione precedente) sono state collegate all'atomizzatore per mezzo di un tubo capillare in silicone. La portata volumetrica impiegata per l'alimentazione è stata di $5 \frac{ml}{min}$. Al fine di indurre il congelamento delle quote di formulazioni atomizzate, il liquido uscente dall'atomizzatore è stato raccolto in flaconi 6R (40x22 mm, Nuova Ompi-Glass Division, Stevanato Group, Piombino Dese (PD), Italia) contenenti al loro interno azoto liquido alla temperatura di circa $-195 \text{ }^\circ\text{C}$. Il passaggio di fase delle gocce ottenute dall'atomizzazione ha inizio a contatto con l'azoto evaporato ed ha termine nel momento in cui esse entrano in contatto con la fase liquida dello stesso presente nel flacone [14]. Per lo scongelamento si è optato per un passaggio di fase lasciato avvenire in aria a temperatura ambiente. A seguito del completamento di quest'ultimo, i flaconi sono stati tappati con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia) in attesa di essere analizzati.

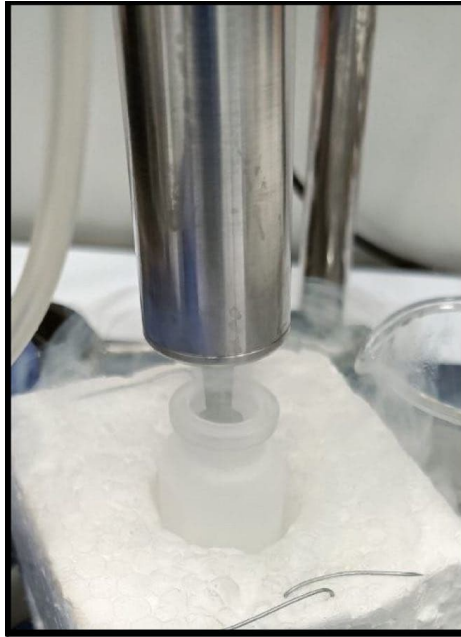


Figura 2.4: Fotografia rappresentante lo spray di una formulazione mediante atomizzatore ad ultrasuoni in un flacone contenente azoto liquido sul fondo. Tecnica SFV/L.

2.2.4 Essiccamento

La prova di essiccamento è stata condotta mediante l'impiego del liofilizzatore LyoBeta (Telstar, Terrassa, Spagna) mostrato nella Figura 2.5, presente nei laboratori DISAT del Politecnico di Torino. Esso risulta essere dotato di:

- una camera da 0.2 m^3 contenente 4 ripiani a temperatura controllata caratterizzati da un'area di 0.16 m^2 ;
- un condensatore sul quale il vapore acqueo che si forma durante le fasi di essiccamento condensa;
- una pompa a vuoto per l'allontanamento dei gas incondensabili;
- un misuratore di pressione capacitativo (Baratron type 626A, MKS Instruments, Andover, MA, USA, con un fondo scala di 10 mbar);
- un misuratore di pressione a conducibilità termica (Pirani type PSG-101-S, Inficon, Bad Ragaz, Switzerland);
- delle termocoppie di tipo T per il monitoraggio della temperatura dei prodotti;
- un sistema di refrigerazione.

Le fasi di atomizzazione e congelamento necessarie all'ottenimento delle formulazioni congelate da sottoporre ad essiccazione, essendo l'essiccamento l'ultima fase dello spray freeze-drying, sono state condotte in maniera analoga a quanto descritto nelle § 2.2.3 e 2.2.2, facendo uso degli stessi strumenti precedentemente indicati e delle medesime condizioni operative. I flaconi 6R (40x22 mm, Nuova Ompi-Glass Division, Stevanato Group,

Piombino Dese (PD), Italia) contenenti 2 ml di ognuna delle formulazioni analizzate (presentate in § 2.2.1), prima di essere disposti all'interno del liofilizzatore, sono stati dotati di tappo in silicone posizionato in modo da permettere il passaggio del vapore acqueo dal flacone alla camera durante l'essiccamento. I flaconi sono stati posizionati sul secondo ripiano in alto con una disposizione a maglia quadrata. Precedentemente a tale operazione, i ripiani erano stati raffreddati ad una temperatura di $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ al fine di preservare il prodotto congelato prima che la fase di essiccamento avesse inizio. Il protocollo adoperato per la prova viene riportato nella Tabella 2.5.



Figura 2.5: Liofilizzatore LyoBeta Telstar, utilizzato per le prove sperimentali di essiccamento.

Tabella 2.5: Protocollo impiegato nella prova di liofilizzazione.

fase	Temperatura [°C]	Velocità [$\frac{K}{min}$]	Tempo	Pressione [Pa]
Congelamento (equilibratura)	-45	-	6 min	101325
Vuoto in camera	-	-	-	10
Essiccamento primario (rampa)	-20	1.25	20 min + eventuale tempo addizionale (lo strumento non procede se non è raggiunto il valore di temperatura richiesto)	10
Essiccamento primario	-20	-	in base al rapporto Pirani/Baratron	10
Essiccamento secondario rampa	20	1.3	30 min + eventuale tempo addizionale (lo strumento non procede se non è raggiunto il valore di temperatura richiesto)	10
Essiccamento secondario	20	-	5 h	10

2.3 Protocollo di analisi dei risultati

Ottenute le formulazioni utili alle analisi a seguito delle fasi di atomizzazione, congelamento/scongelo ed essiccamento, si è proceduto ad osservare, per ognuna di esse, la quantità di attività biologica residua.

La procedura adoperata, come precedentemente affermato (§ 2.1) pone le basi sulla capacità della mioglobina di catalizzare la reazione di ossidazione dell'ABTS in presenza di perossido di idrogeno. Avendo notato come una differente concentrazione della proteina modello in soluzione impattasse sul progresso della reazione, si è andati ad osservare l'andamento dell'assorbanza, a 420 nm, avutasi impiegando le differenti formulazioni, sottoposte alle diverse fasi, come fonti di mioglobina per delle soluzioni contenenti ABTS 10 mM ed H₂O₂ 5 mM.

Il protocollo impiegato risulta essere lo stesso sia nel caso in cui le formulazioni siano state solo atomizzate, sia nel caso in cui esse siano andate in contro ad un processo di congelamento/scongelo. Nel solo caso di essiccamento è stata necessaria una fase aggiuntiva, in quanto, a seguito di tale passo del processo, le formulazioni sono state ricostituite attraverso l'impiego di 2 ml di acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kabi, Verona, Italia).

L'analisi dell'attività biologica residua della mioglobina, per ognuna delle formulazioni ottenute a seguito di ognuna delle 3 differenti fasi, è stata eseguita come segue:

- Ipotizzando che, a seguito della fase a cui si sono sottoposte le formulazioni, la quantità di mioglobina in esse contenuta rimanga costante e pari al valore iniziale,

è stato necessario operare una diluizione per mezzo di buffer citrato 10 mM a pH 6.5. Tale operazione è stata svolta al fine di avere una concentrazione di Mb, nel momento in cui la si pone in soluzione con ABTS e H₂O₂, idealmente uguale alla concentrazione di riferimento individuata nell'elaborazione del saggio, ossia, 0.05 $\frac{\mu g}{ml}$.

- Il passo successivo è stato quello di preparare una soluzione stock di ABTS 30 mM (impiegando buffer citrato 10 mM a pH 6.5) ed una di H₂O₂ 15 mM (attraverso l'uso di acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kabi, Verona, Italia)).
- Per ognuna delle formulazioni diluite, sono state prelevate 3 aliquote da 50 μl e disposte in un numero eguali di pozzetti di una piastra multiwell (Greiner Bio-one, Cassina de' Pecchi (MI), Italia). Inoltre, ad ognuna di esse, sono state affiancate ulteriori tre quote da 50 μl facenti riferimento alla medesima formulazione, opportunamente diluita, su cui non si era svolta alcuna operazione. Difatti, prima di eseguire i processi di atomizzazione, congelamento/scongelo ed essiccamento, per ogni formulazione, sono stati prelevati 2 ml da utilizzare come valore iniziale per il confronto dell'attività biologica persa a seguito della fase dello spray freeze-drying eseguita.
- In ognuno dei pozzetti occupati dalle formulazioni, è stata aggiunta una quantità di ABTS pari a 50 μl e, solo successivamente, 50 μl di perossido di idrogeno. Avendo la reazione inizio immediato, l'ultima operazione è stata svolta mediante l'ausilio di una micropipetta multicanale al fine di velocizzare il processo. In questo modo si è evitato che trascorresse un grande lasso di tempo tra il momento in cui l'H₂O₂ è aggiunto nelle prime posizioni e l'istante in cui lo si aggiunge alle ultime.
- La piastra multiwell (Greiner Bio-one, Cassina de' Pecchi (MI), Italia), caratterizzata da pozzetti occupati contenenti soluzioni in volume pari a 150 μl , contraddistinte da concentrazioni di ABTS e perossido rispettivamente pari a 10 mM e 5 mM ed una quantità di mioglobina idealmente eguale a 0.05 $\frac{\mu g}{ml}$, è stata analizzata attraverso l'impiego di uno spettrofotometro UV/visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Mediante tale strumento, infatti, è stato osservato l'andamento dell'assorbimento a 420 nm nelle varie formulazioni, per un tempo di 30 minuti ed alla temperatura di 25 °C. La lettura di tale valore da parte dello spettrofotometro è stata impostata con una cadenza temporale pari ad un minuto.
- Comparando l'incremento di assorbanza determinato da ognuna delle formulazioni a seguito della fase dello spray freeze-drying valutata con quello avutosi dalla medesima formulazione non processata, è stato possibile determinare l'attività biologica residua successivamente ad ognuna delle operazioni unitarie che compongono lo SFD.

Capitolo 3

Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati delle prove sperimentali condotte presso i laboratori del gruppo di ricerca Molecular Engineering (mole) presso il Politecnico di Torino. Sono inizialmente mostrati gli esiti che hanno permesso l'elaborazione del saggio ABTS. Esso si basa sul processo di ossidazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) da parte del perossido di idrogeno (H_2O_2) e sulla capacità della mioglobina di catalizzare tale reazione. Successivamente, vengono ad essere riportati, per ognuna delle fasi dello spray freeze-drying, i valori dell'attività biologica residua della proteina modello nelle differenti formulazioni valutate.

3.1 Saggio ABTS

3.1.1 Lunghezza d'onda ottimale

Con riferimento al protocollo descritto in § 2.1.1, si mostrano i risultati che hanno portato all'individuazione della lunghezza d'onda a cui si manifesta il massimo di assorbimento dell'ABTS ossidato.

Nella Figura 3.2 e, in modo meno marcato, nella Figura 3.1 si osserva la presenza di un picco di assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm. Tale risultato trova riscontro con quanto presente in letteratura; nella maggior parte dei casi, infatti, i valori impiegati per l'individuazione della forma ossidata dell'ABTS si presentano nell'intervallo [405-440] nm, più raramente nell'intorno dei 735 nm [10]. Le due figure sono state ottenute per soluzioni aventi differenti concentrazioni di ABTS e di H_2O_2 ; in particolare, per la Figura 3.2 si ha ABTS 3.125 mM, H_2O_2 37.5 mM, invece, per la Figura 3.1 le concentrazioni risultano ABTS 12.5 mM, H_2O_2 30 mM. Tali valori fanno riferimento alle soluzioni in cui l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) subisce l'ossidazione (curve azzurre), per la quale, è richiesta la presenza di perossido. Al fine di valutare l'andamento delle assorbanze in assenza di reazione (curve arancioni), sono state impiegate delle soluzioni aventi le stesse quantità di ABTS ma in presenza del solo buffer citrato.

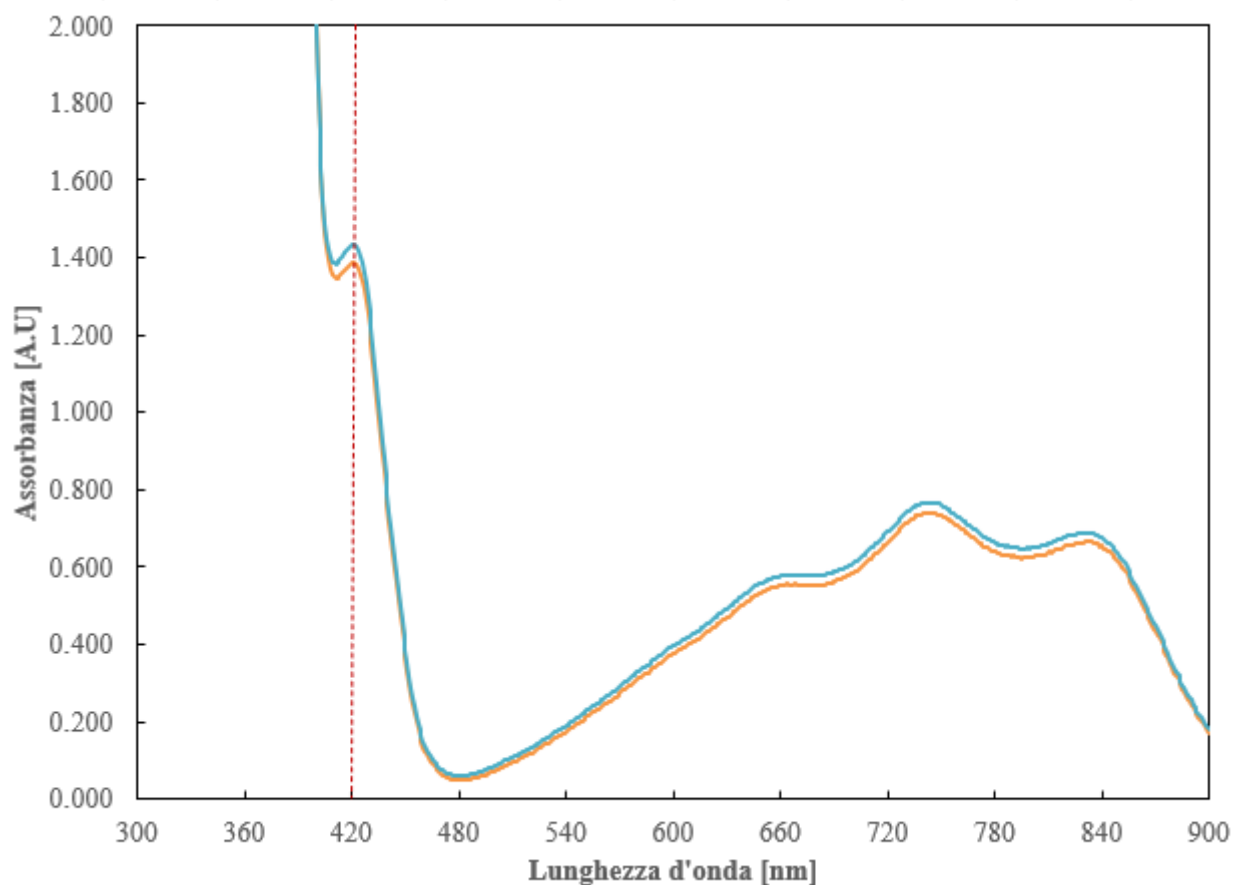


Figura 3.1: Spettro di assorbanza dell'ABTS non reagito (in arancione) e dell'ABTS ossidato (in azzurro) per lunghezze d'onda che variano in un intervallo compreso tra i 300 nm ed i 900 nm. Le curve sono state ottenute entrambe impiegando una concentrazione di ABTS pari a 12.5 mM. Per l'ottenimento della curva in arancione non è stato utilizzato il perossido di idrogeno, contrariamente, per avere la reazione da cui è poi scaturita la curva di assorbimento in azzurro si è impiegato H_2O_2 con una concentrazione di 30 mM.

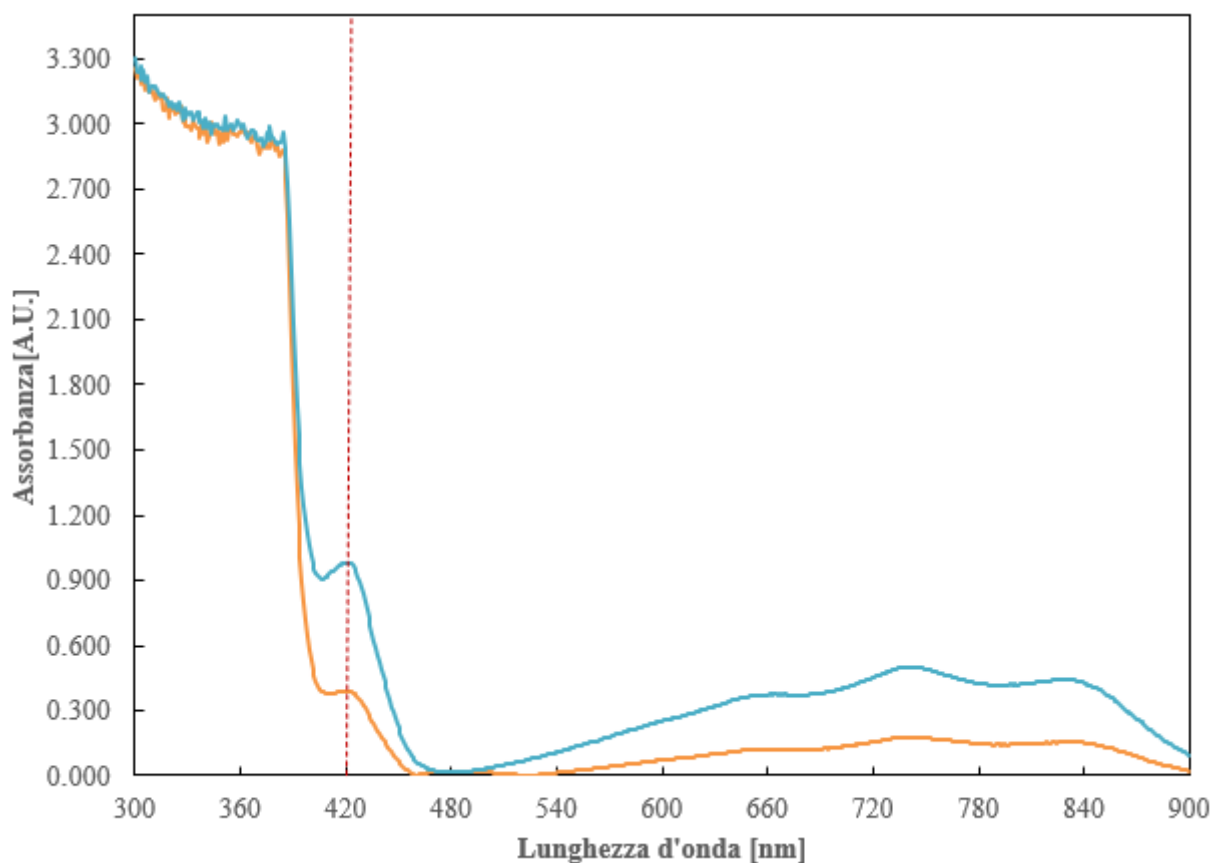


Figura 3.2: Spettro di assorbanza dell'ABTS non reagito (in arancione) e dell'ABTS ossidato (in azzurro) per lunghezze d'onda che variano in un intervallo compreso tra i 300 nm ed i 900 nm. Le curve sono state ottenute entrambe impiegando una concentrazione di ABTS pari a 3.125 mM. Per l'ottenimento della curva in arancione non è stato utilizzato il perossido di idrogeno, contrariamente, per avere la reazione da cui è poi scaturita la curva di assorbimento in azzurro si è impiegato H_2O_2 con una concentrazione di 37.5 mM.

Osservando le Figure 3.1 e 3.2 si può notare che il picco individuato a 420 nm risulta presente anche nelle curve rappresentative dello spettro di assorbanza dell'ABTS non reagito. Tale risultato lascia presumere che, a seguito della dissoluzione dell'acido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) all'interno del buffer impiegato, si manifesti la presenza della forma ossidata del reagente di interesse. L'aggiunta dell' H_2O_2 permette, dunque, lo sviluppo della reazione aumentando la quantità di ABTS ossidato con il conseguente accentuarsi del picco alla lunghezza d'onda di 420 nm. Ulteriore conferma di ciò è stata data dalla colorazione della soluzione stock osservata. In letteratura, infatti, si fa riferimento all'ABTS come una sostanza incolore [22], mentre, come mostrato nella Figura 3.3, è possibile osservare una colorazione verde, sinonimo della presenza in soluzione del radicale cationico $ABTS^{\cdot+}$ frutto dell'ossidazione.



Figura 3.3: Soluzione stock ABTS in buffer citrato 30 mM. La colorazione verde è sinonimo della presenza in soluzione del radicale cationico $ABTS^{\cdot+}$ frutto dell'ossidazione.

3.1.2 Effetto del pH sulla reazione di ossidazione

Nelle Figure 3.4, 3.5 e 3.6 sono riportati gli andamenti dell'assorbanza a 420 nm ottenuti per soluzioni aventi le stesse concentrazioni di ABTS ed H_2O_2 , rispettivamente pari a 10 mM e 5 mM, ma valori di pH differenti. In particolare, le figure fanno riferimento a valori di pH pari a: 6.5 (Figura 3.4), 7 (Figura 3.5) ed 8 (Figura 3.6). Tutte le soluzioni sono state lasciate reagire per un tempo di 30 minuti ad una temperatura di 25°C in assenza di mioglobina.

Le Figure 3.4, 3.5 e 3.6 mostrano in maniera evidente che, piuttosto del manifestarsi di un incremento di assorbanza correlabile ad un aumento della concentrazione di $ABTS^{\cdot+}$, si abbia una decrescita di tale valore. Ciò è indicativo della scomparsa del composto ossidato inizialmente presente in soluzione. Tale fenomeno, infatti, può avvenire naturalmente in quanto il radicale cationico frutto dell'ossidazione risulta stabile solitamente per valori di pH inferiori a 3.7 [10].

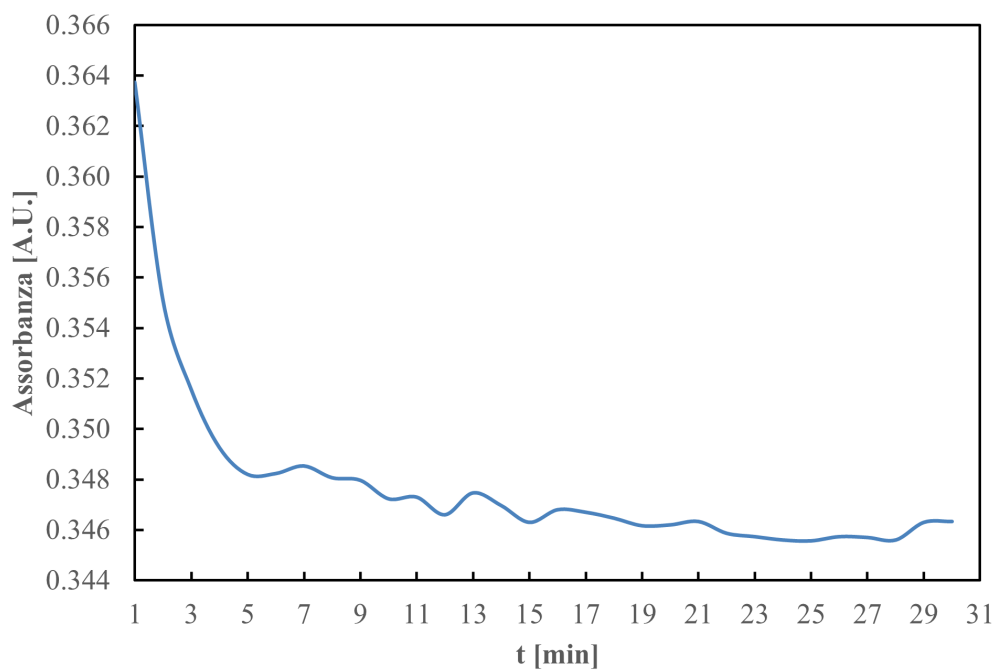


Figura 3.4: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari a 6.5 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.

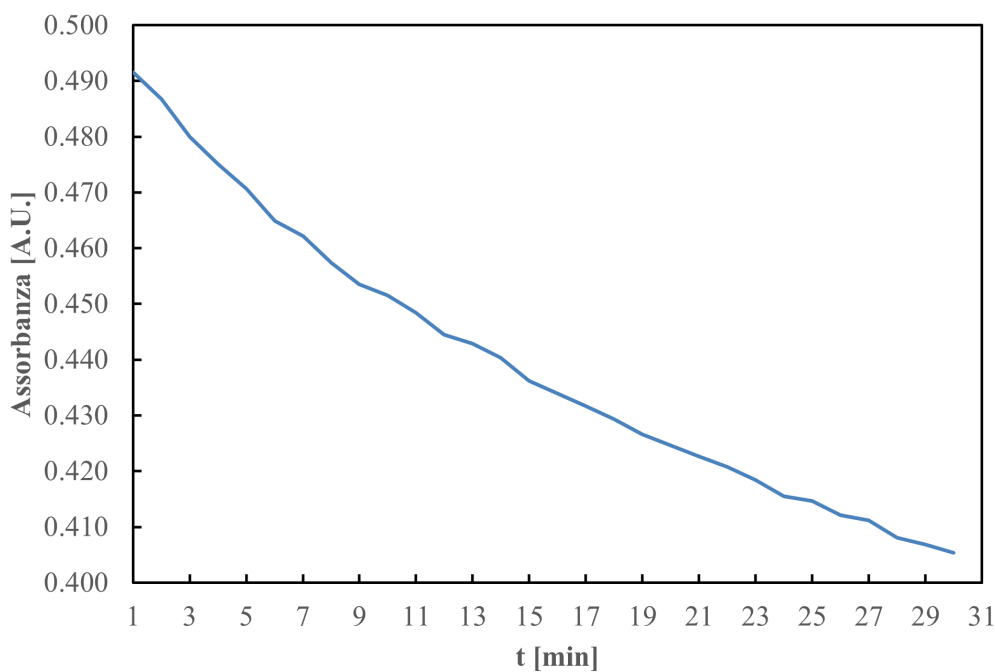


Figura 3.5: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari a 7 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.

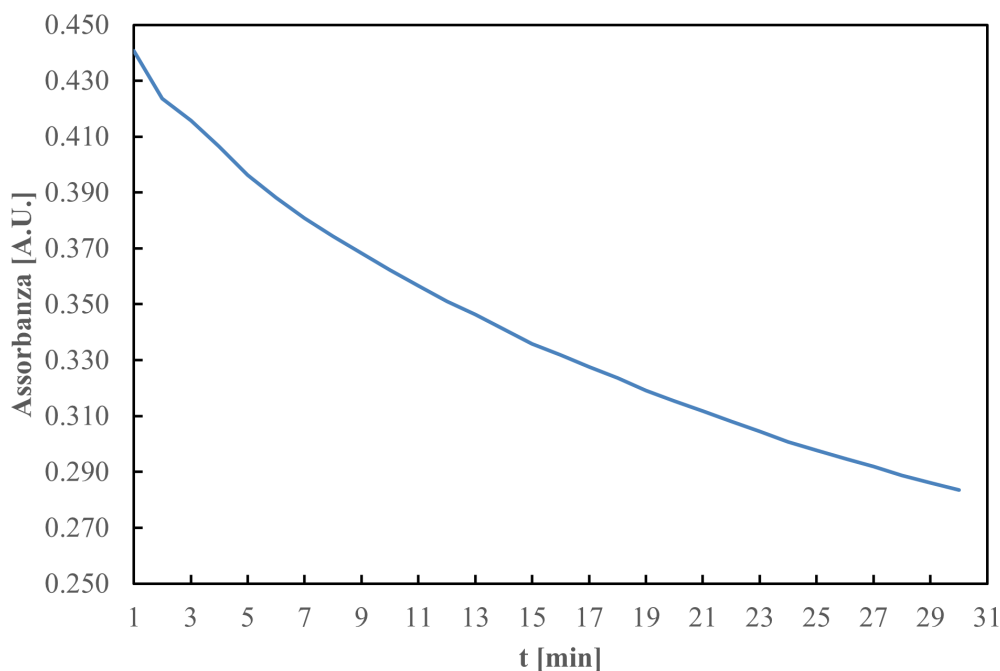


Figura 3.6: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 8 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.

L'aggiunta di mioglobina alle soluzioni su indicate, analizzate impiegando le stesse condizioni operative, porta all'ottenimento di risultati del tutto differenti rispetto a quelli appena discussi. Infatti, nelle Figure 3.7, 3.8 e 3.9, nonostante l'assorbanza sia superiore all'unità e, dunque, non correlabile in maniera lineare secondo la legge di Lambert Beer alla concentrazione dell'ABTS ossidato (problema risolvibile attraverso un'operazione di diluizione), gli andamenti lasciano intuire che la presenza di mioglobina permetta lo sviluppo della reazione in maniera marcata ed in tempi relativamente brevi. Tali considerazioni assumono forte rilevanza se si considera che, nelle medesime condizioni operative in assenza della proteina, la reazione non risulta manifestarsi per un uguale tempo di osservazione. Dalle Figure 3.7, 3.8 e 3.9, inoltre, è possibile notare come il raggiungimento del plateau da parte delle curve avvenga: per valori di tempo crescenti al crescere del pH valutato (fissata la concentrazione di mioglobina); per valori di tempo decrescenti al crescere della concentrazione di mioglobina (fissato il pH).

Per un pH pari a 6.5, dunque, la decrescita del valore di assorbanza in assenza di mioglobina (Figura 3.4) risulta meno marcata se comparata a quanto avviene nei casi di pH pari a 7 ed 8 (Figure 3.5 e 3.6) e al contempo, si nota che, in presenza di tale proteina, esso mostra una crescita più rapida dello stesso valore rispetto a tutte le altre casistiche valutate. Per tali motivi il valore di pH di 6.5 è stato scelto per essere impiegato nell'analisi delle formulazioni a seguito delle varie fasi dello spray freeze-drying.

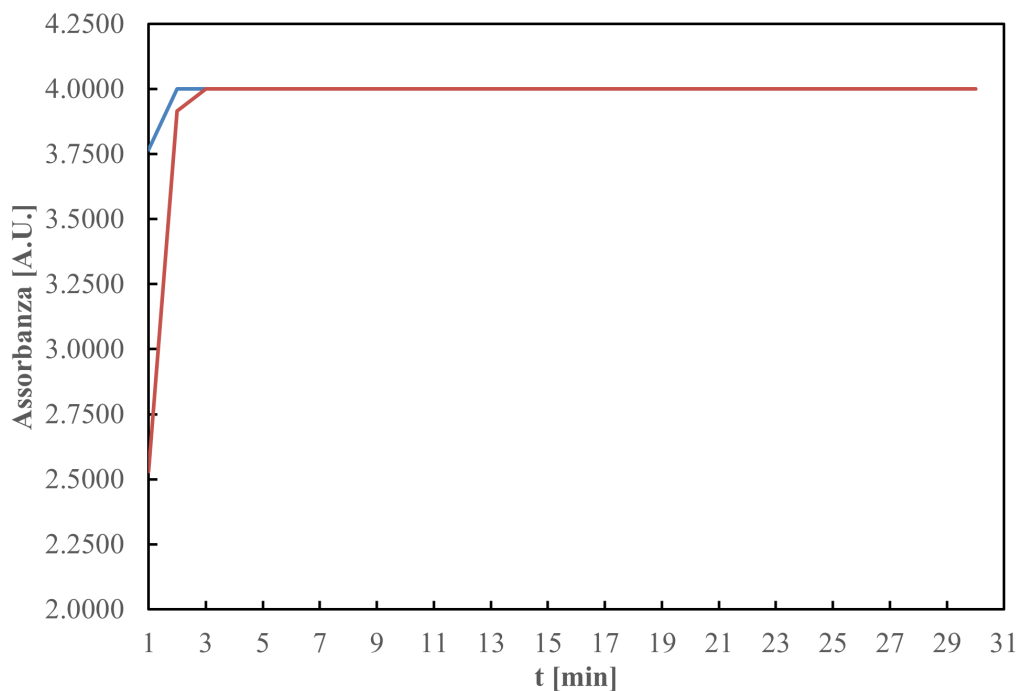


Figura 3.7: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 6.5 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione $0.1 \frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e $0.05 \frac{mg}{ml}$ (curva rossa).

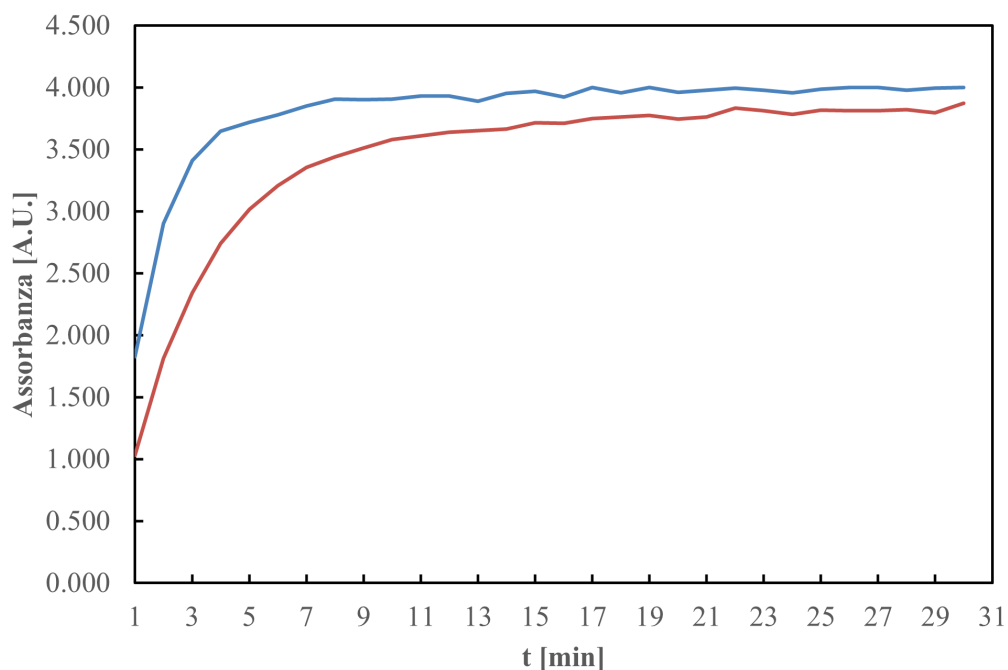


Figura 3.8: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 7 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione $0.1 \frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e $0.05 \frac{mg}{ml}$ (curva rossa).

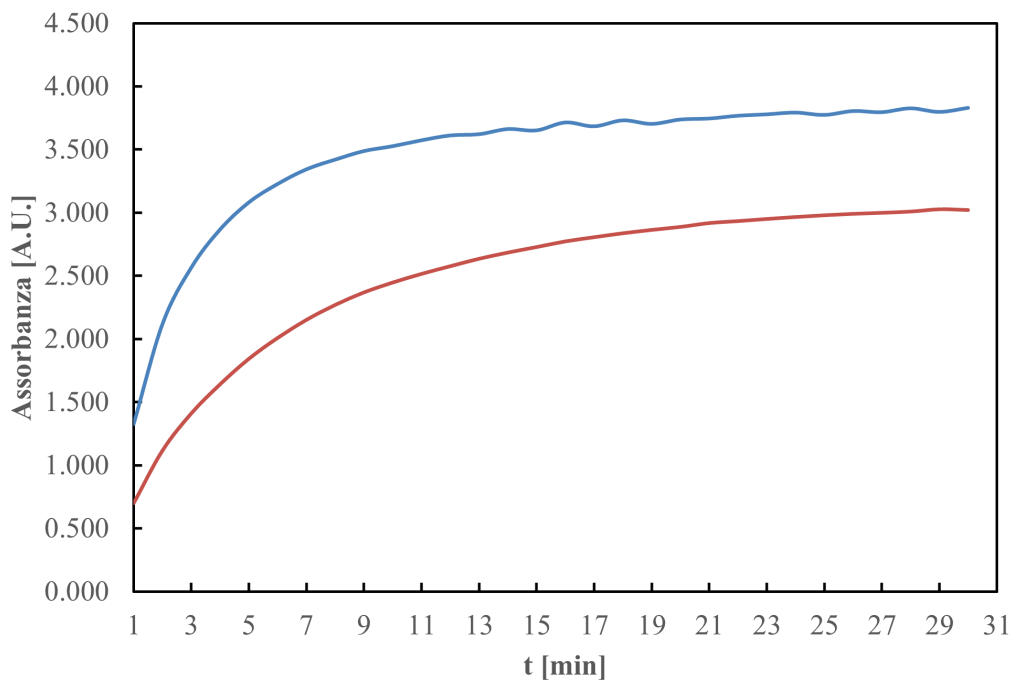


Figura 3.9: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 8 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione 0.1 $\frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e 0.05 $\frac{mg}{ml}$ (curva rossa).

3.1.3 Effetto della concentrazione di mioglobina sulla reazione di ossidazione

Fissato il valore di pH, avendo evidenziato nelle Figure 3.7, 3.8 e 3.9 l'importanza della presenza di mioglobina per la reazione di ossidazione dell'ABTS e l'impatto che differenti concentrazioni di tale proteina possono avere su di essa, si è andati a ritrovare la quantità di Mb che permettesse di avere una crescita di assorbanza nel corso del tempo graduale e il cui valore finale fosse ≤ 1 (in modo da poter correlare in maniera lineare l'assorbanza alla concentrazione dell'ABTS $^{\cdot+}$).

Nelle Figure 3.11 e 3.10 si riportano i risultati delle prove condotte su soluzioni con differenti concentrazioni di mioglobina al pH fissato di 6.5. La reazione, anche per queste analisi, è stata valutata con concentrazioni di ABTS e H_2O_2 rispettivamente eguali a 10 e 5 mM, per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.

La Figura 3.10 pone in evidenza come, all'aumentare della concentrazione di mioglobina, la velocità di reazione risulti a sua volta incrementarsi. I risultati mostrati nella Figura 3.11, invece, permettono di fare due importanti considerazioni:

- esiste una soglia minima di concentrazione di mioglobina al di sotto della quale la quantità di proteina impiegata nei 30 minuti di osservazione non risulta sufficiente affinché l'ossidazione sia favorita rispetto alla scomparsa del prodotto ossidato. Dalla Figura 3.11, infatti, è possibile notare in maniera chiara come, per concentrazioni inferiori ai 200 $\frac{ng}{ml}$, vi sia una costante decrescita del valore di assorbanza;
- la concentrazione di proteina in soluzione, se non adeguatamente alta, seppur favorisca lo sviluppo della reazione non ne permette un andamento costantemente

crescente nel corso dei 30 minuti valutati. È possibile notare, infatti, anche se in maniera non del tutto evidente, che per una concentrazione di $200 \frac{ng}{ml}$ il valore di assorbanza giunto ad un massimo vada poi incontro a una lieve decrescita. Le concentrazioni valutate in Figura 3.10, invece, risultano essere tali da permettere il raggiungimento di un plateau nei 30 minuti di osservazione. Tale considerazione risulta importante in quanto, come sarà possibile notare nelle seguenti sezioni, le formulazioni con una maggiore perdita di attività biologica presenteranno curve mostranti tale andamento.

Con riferimento alla Figura 3.10 si osserva come una concentrazione della proteina di interesse in soluzione di $0.5 \frac{\mu g}{ml}$ permetta uno sviluppo apprezzabile della reazione nell'intervallo di tempo valutato e l'ottenimento di un valore massimo di assorbanza inferiore all'unità (correlabile linearmente alla concentrazione del radicale cationico frutto dell'ossidazione secondo la legge di Lambert Beer). Per tale motivo, nell'ambito dello sviluppo del saggio, la concentrazione di mioglobina a cui far riferimento per l'analisi dei campioni ottenuti a seguito delle varie fasi dello spray freeze-drying è stata fissata a $0.5 \frac{\mu g}{ml}$.

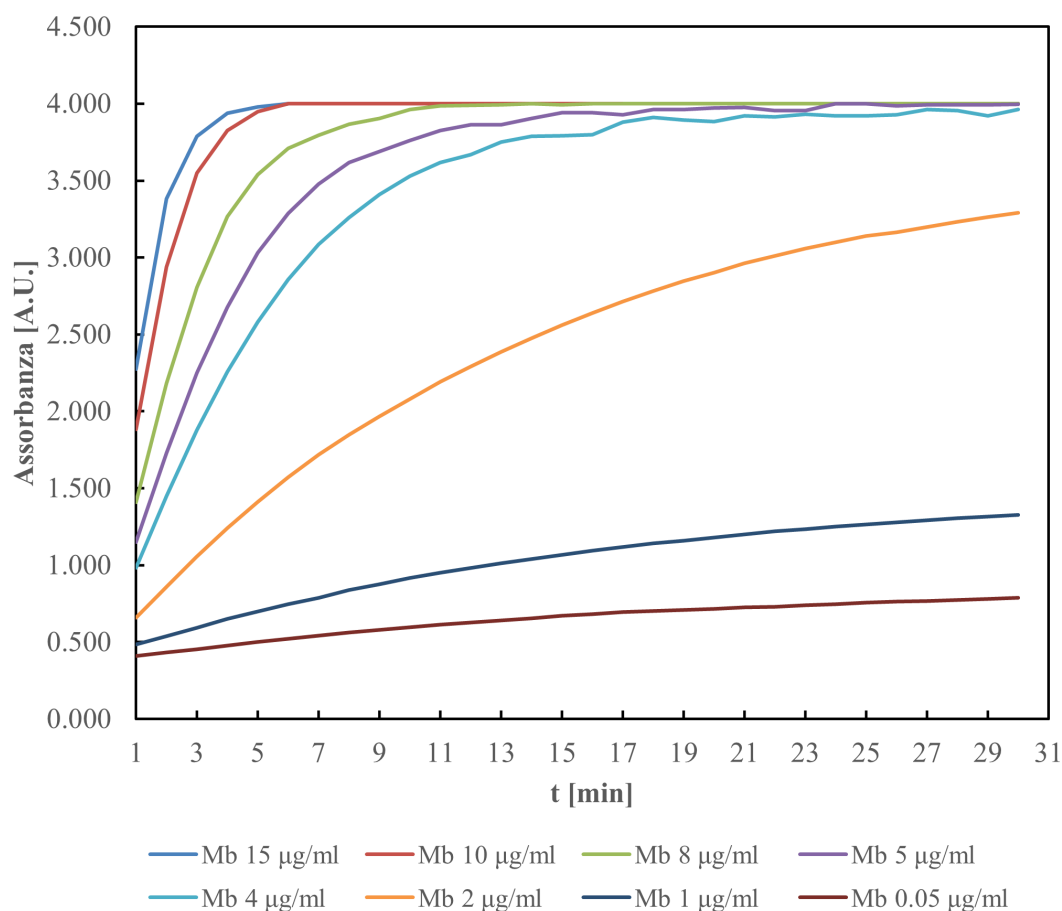


Figura 3.10: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per soluzioni di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, aventi pH pari a 6.5 e lasciate reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C. Ogni soluzione presenta differenti concentrazioni di mioglobina, tali valori variano in un intervallo tra $15 \frac{\mu g}{ml}$ e $0.05 \frac{\mu g}{ml}$.

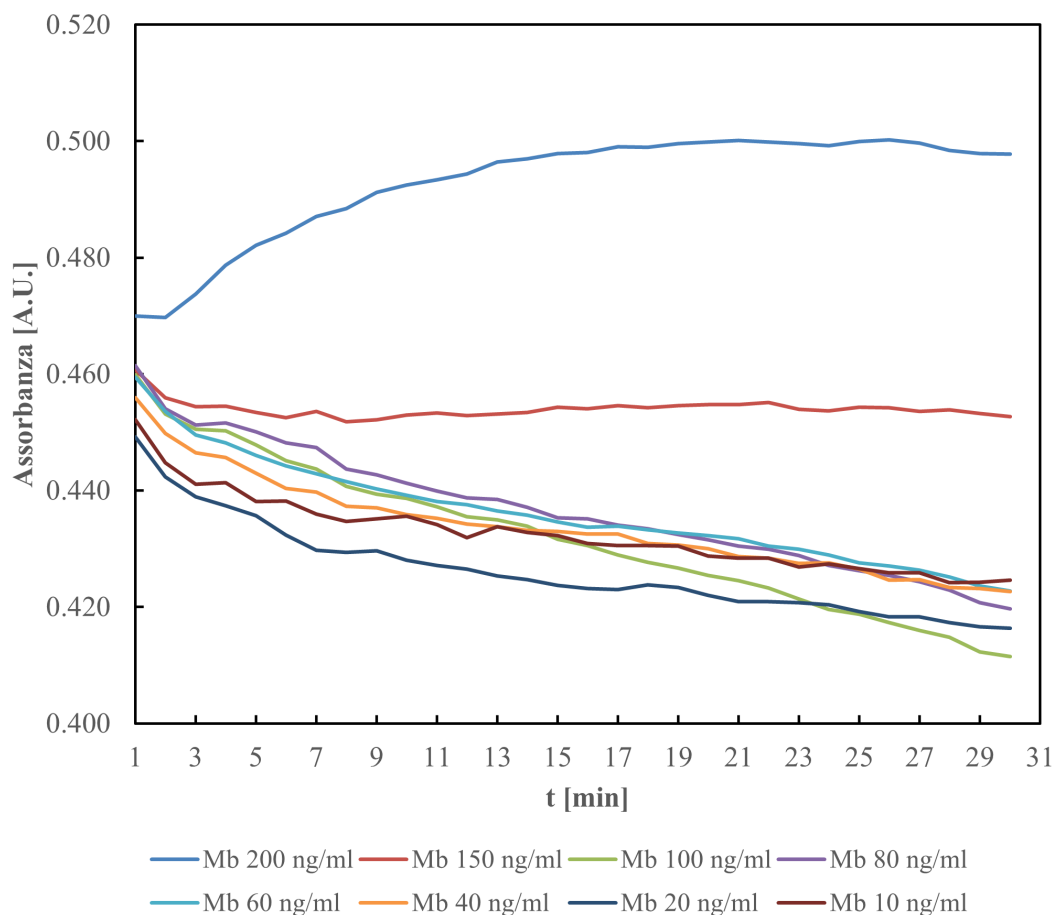


Figura 3.11: Andamento dell'assorbanza a 420 nm per soluzioni di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, aventi pH pari a 6.5 e lasciate reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C. Ogni soluzione presenta differenti concentrazioni di mioglobina, tali valori variano in un intervallo tra $200 \frac{ng}{ml}$ e $10 \frac{ng}{ml}$

3.2 Risultati per le differenti fasi dello SFD

Nella seguente sezione sono riportati i risultati dell'attività biologica residua della mioglobina a seguito di ognuna delle fasi del processo di spray freeze-drying. Dettagli relativi alle formulazioni impiegate sono presenti in § 2.2.1.

I risultati saranno presentati facendo riferimento ad un tempo di osservazione di 9 minuti. Il protocollo adoperato per il loro ottenimento è descritto in maniera dettagliata in § 2.3.

La scelta di un tempo pari a 9 minuti come riferimento per le analisi dell'andamento dell'assorbanza, si basa sulla volontà di individuare un intervallo temporale entro il quale, indipendentemente dalla fase analizzata e dalla formulazione, sia possibile averne un andamento crescente. Dal confronto delle curve presenti nelle Figure 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17 è infatti visibile come, nel caso dell'essiccamento in assenza di Tween 80, l'assorbanza, inizialmente crescente, risulti successivamente decrescere. In accordo con quanto detto in § 3.1.3, ciò risulta sinonimo del fatto che la concentrazione di mioglobina sia tale da favorire la reazione in un primo momento ma non così alta da permetterne un prosieguo costante nei 30 minuti di osservazione. Fissando il tempo di analisi a 9 minuti,

invece, è possibile avere un andamento crescente per ognuna delle curve presenti nelle figure sottostanti. In questo modo, è stato possibile effettuare un calcolo dei risultati che avesse come riferimento lo stesso istante di tempo per tutte le differenti casistiche analizzate e in cui la formazione di ABTS^+ fosse favorita rispetto a una sua scomparsa.

Al fine di evidenziare se gli andamenti calcolati per l'attività biologica residua nelle diverse formulazioni a seguito di ognuna delle fasi dello SFD fossero influenzati dalla base di calcolo adoperata, si è deciso di ricavare quest'ultimi non solo impiegando un tempo di analisi di 9 minuti per l'andamento dell'assorbanza ma anche facendo riferimento ai massimi valori da essa raggiunti, nell'arco temporale complessivo di 30 minuti per cui è stata valutata la reazione di ossidazione dell'ABTS, per ognuna delle diverse soluzioni considerate. Questa seconda metodologia di calcolo è stata ritenuta applicabile in quanto, seppur le varie formulazioni mostrino massimi di assorbanza ad istanti di tempo differenti, si è osservato che tale valore è strettamente correlato alla quantità di mioglobina presente nella soluzione e in grado di catalizzare la reazione (Figure 3.10 e 3.11). Ad ogni modo, per entrambe le basi di calcolo, gli esiti relativi agli andamenti dell'attività biologica per le varie formulazioni successivamente alle tre fasi dello SFD sono risultati identici. Un esempio di ciò è mostrato in § 3.2.1 ove, per quanto ottenuto a seguito della fase di atomizzazione in assenza di Tween 80, sono riportati i risultati mediante entrambe le basi di calcolo (Figure 3.18 e 3.19). Per tale motivo, si è deciso di presentare soltanto quelli facenti riferimento ad un tempo di analisi di 9 minuti.

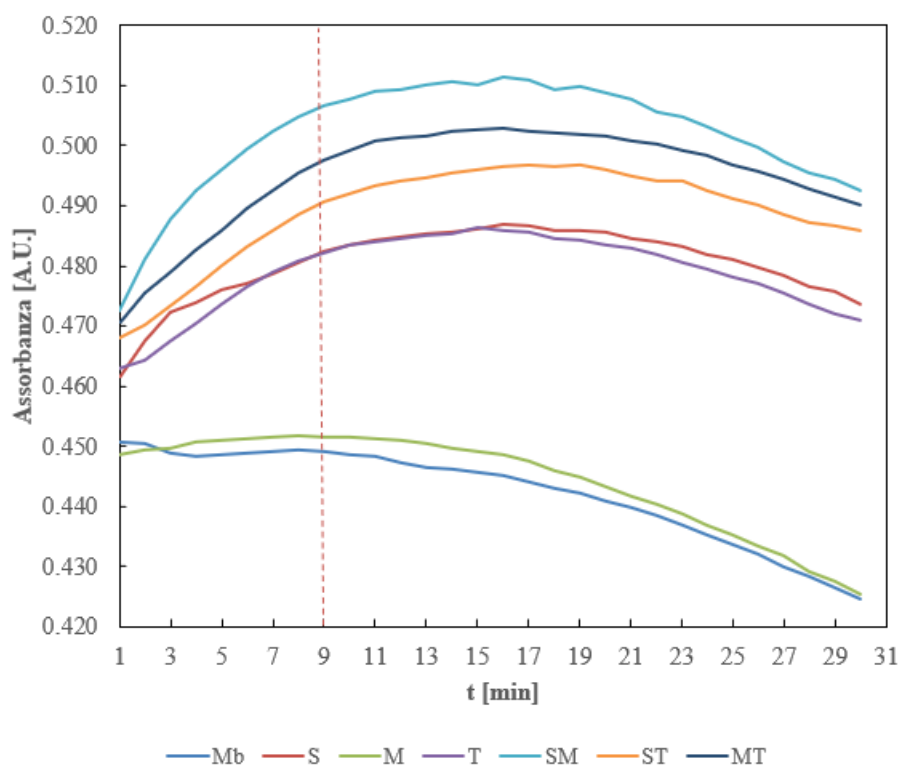


Figura 3.12: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito della fase di essiccamento in assenza di tensioattivo.

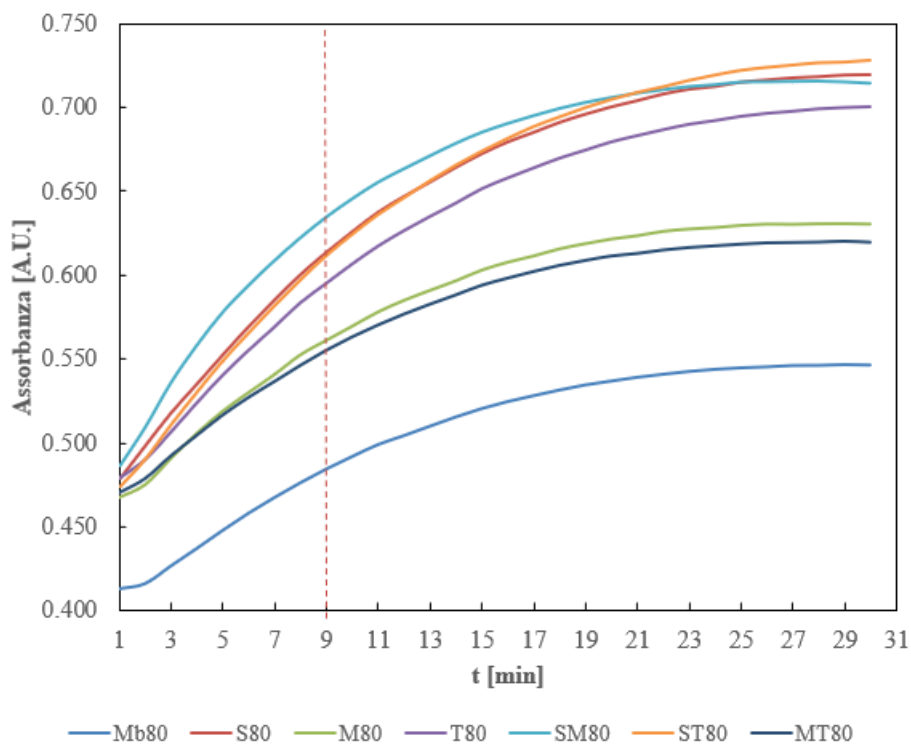


Figura 3.13: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di essiccamento in presenza di Tween80.

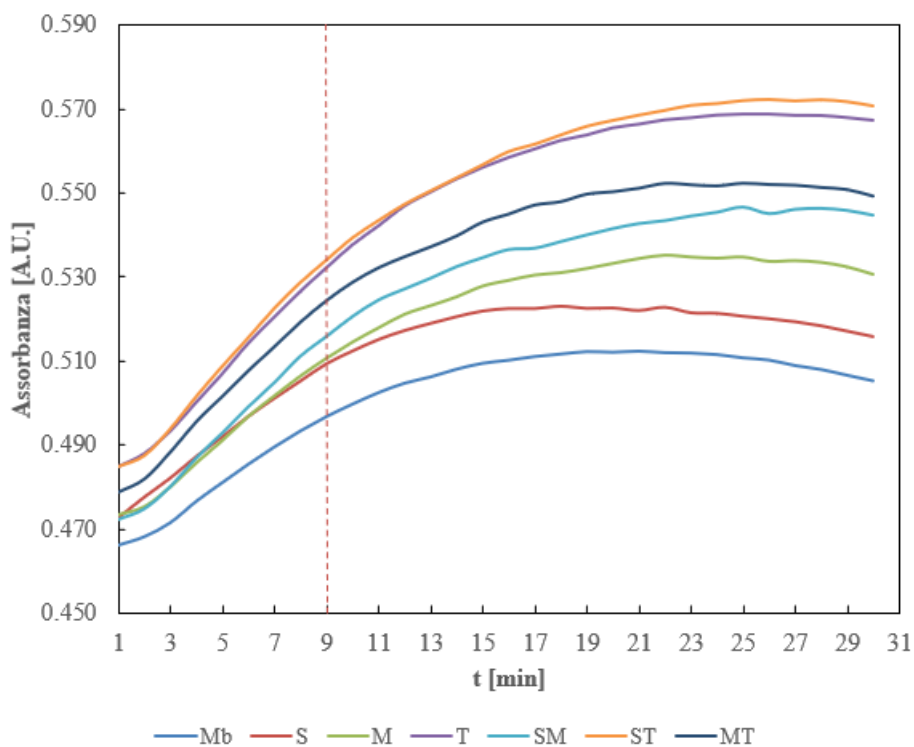


Figura 3.14: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di atomizzazione in assenza del tensioattivo.

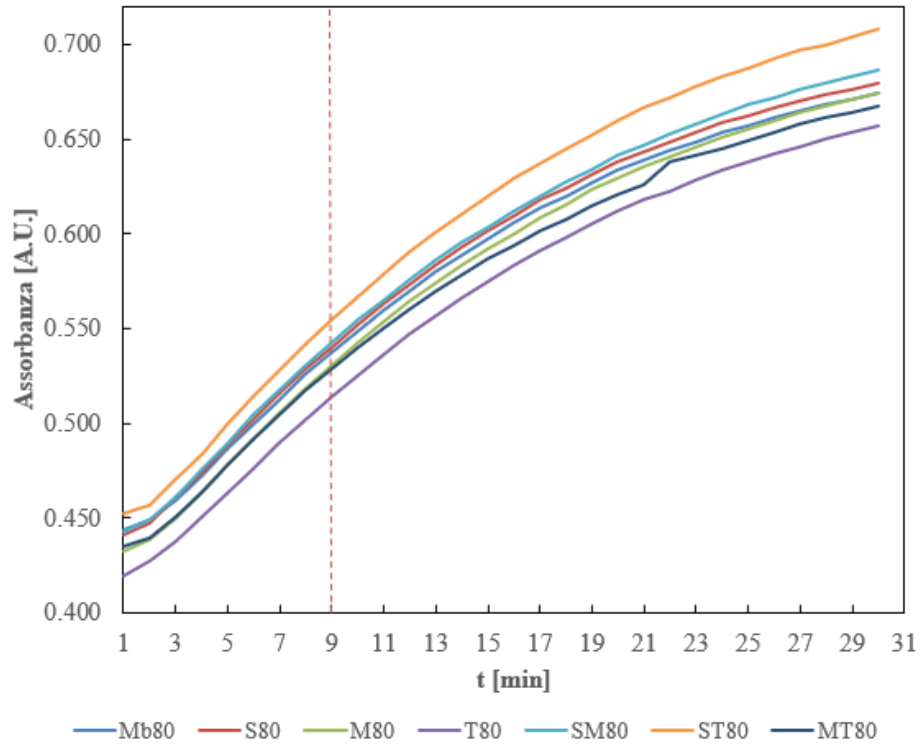


Figura 3.15: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di atomizzazione in presenza del tensioattivo.

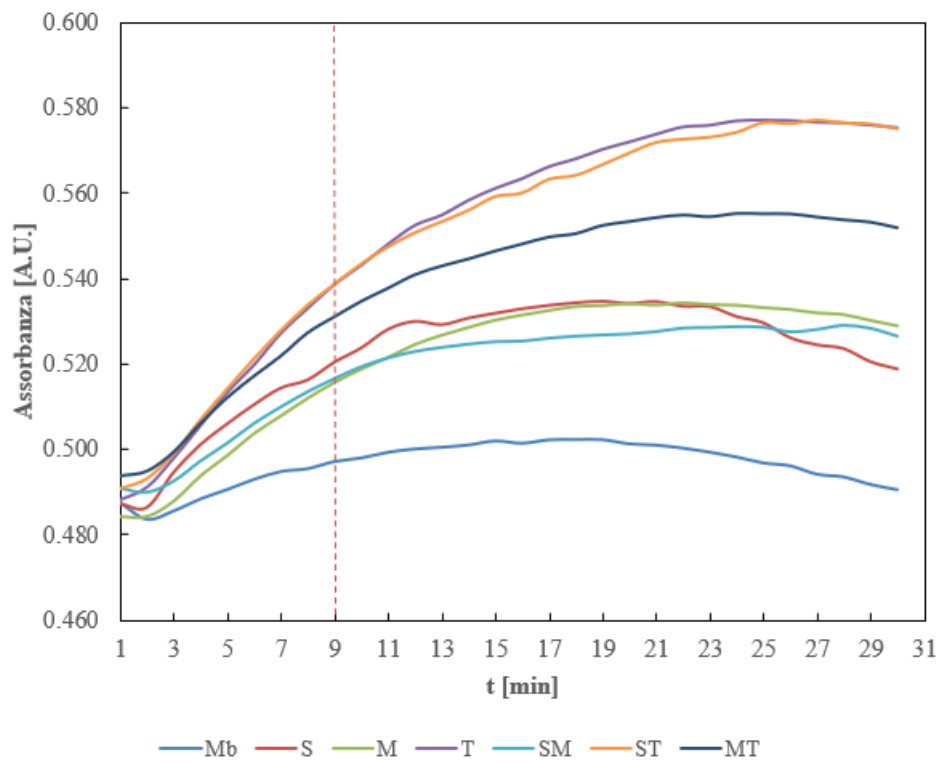


Figura 3.16: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di congelamento/scongelo in assenza di Tween80.

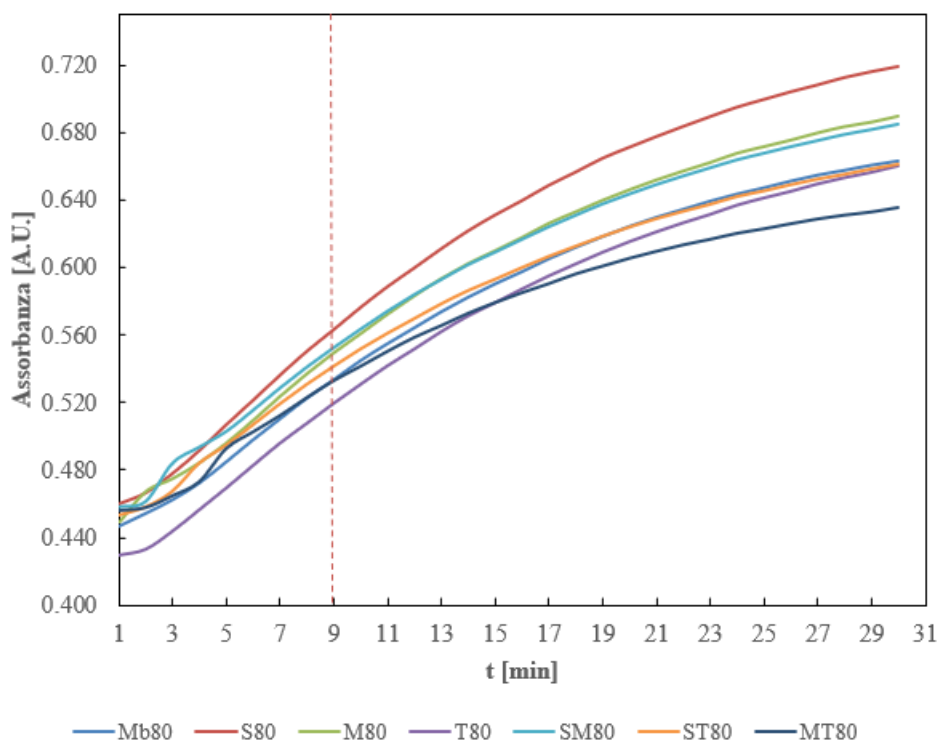


Figura 3.17: Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di congelamento/scongelo in presenza di Tween80.

3.2.1 Impatto dell'atomizzazione sull'attività biologica

Di seguito saranno mostrati i valori di attività biologica residua ottenuti dopo aver sottoposto le varie formulazioni valutate, descritte in § 2.2.1, alla sola fase di atomizzazione. Il procedimento adoperato per l'esecuzione della prova è invece riportato in dettaglio in § 2.3.

Durante la fase di atomizzazione gli stress di natura meccanica e l'elevata interfaccia gas-liquido che si genera nel decorso del processo sono, in genere, le principali cause di denaturazione proteica. Gli sforzi di taglio a cui la proteina è sottoposta, seppur da soli non risultino avere un impatto importante sull'attività biologica, in combinazione con l'elevata interfaccia gas-liquido sulla quale essa può adsorbirsi, possono potenzialmente favorirne la denaturazione e il verificarsi di possibili fenomeni di aggregazione.

Effetto degli eccipienti in assenza del tensioattivo nella fase di atomizzazione

Le Figure 3.18 e 3.19 mostrano i risultati ottenuti rispettivamente a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti e impiegando il massimo valore di assorbanza raggiunto dopo un lasso temporale di 30 minuti. Come si può notare, nonostante facciano riferimento a due basi differenti di calcolo, gli andamenti risultano del tutto analoghi. Entrambe le figure, dunque, permettono di giungere alle medesime conclusioni.

Con riferimento alle Figure 3.18 e 3.19, il processo di atomizzazione sembrerebbe non impattare fortemente sull'attività biologica della proteina modello. Ciò risulta essere vero sia per la soluzione di mioglobina nel solo buffer citrato sia nel momento in cui essa venga ad essere atomizzata in presenza di eccipienti. Osservando i soli valori medi di attività

biologica residua ottenuti per le diverse formulazioni, se ne potrebbe dedurre che la presenza del solo saccarosio in soluzione, inaspettatamente, abbia un effetto deleterio e che la formulazione di maggiore efficacia risulti quella con la compresenza dei disaccaridi. Tuttavia, se si considera l'elevata variabilità da cui sono affetti alcuni dei risultati, resa evidente nelle figure dalla barra d'errore, non è possibile dare certezza a tale considerazione. Le formulazioni sembrano mostrare tutte un comportamento molto simile se confrontate con la soluzione di mioglobina nel solo buffer citrato. Si può notare, infatti, il sussistere di una sovrapposizione importante dell'intervallo dei valori ottenuti per tale soluzione con quelli delle diverse formulazioni contenenti eccipienti. Ciò lascia presumere che quest'ultimi non abbiano un impatto rilevante nella protezione della proteina nel corso della fase di atomizzazione. Tale considerazione trova riscontro in letteratura dove è possibile reperire fonti in cui si afferma che gli eccipienti valutati abbiano un effetto trascurabile nella preservazione dell'attività biologica da un eventuale adsorbimento all'interfaccia gas-liquido [23]. Essi, piuttosto, sono solitamente impiegati nei processi che prevedono una fase di atomizzazione al fine di proteggere la molecola processata dagli stress che nascono nelle fasi successive.

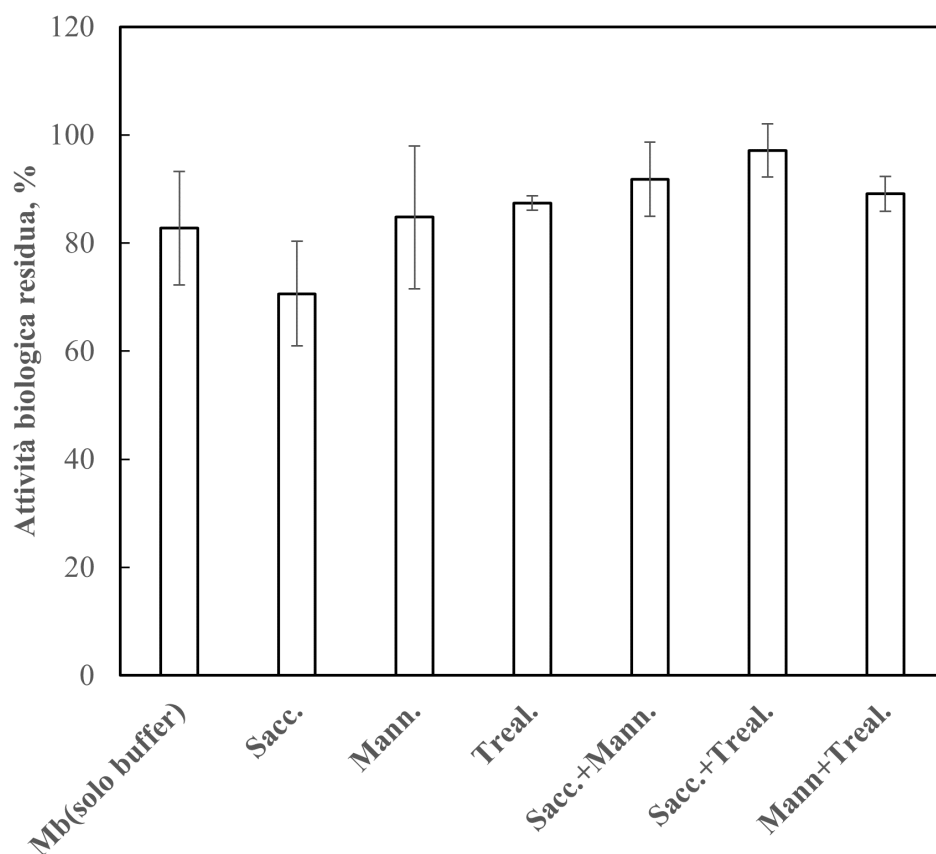


Figura 3.18: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito della fase di atomizzazione. Risultati ottenuti per un tempo di analisi di 9 minuti.

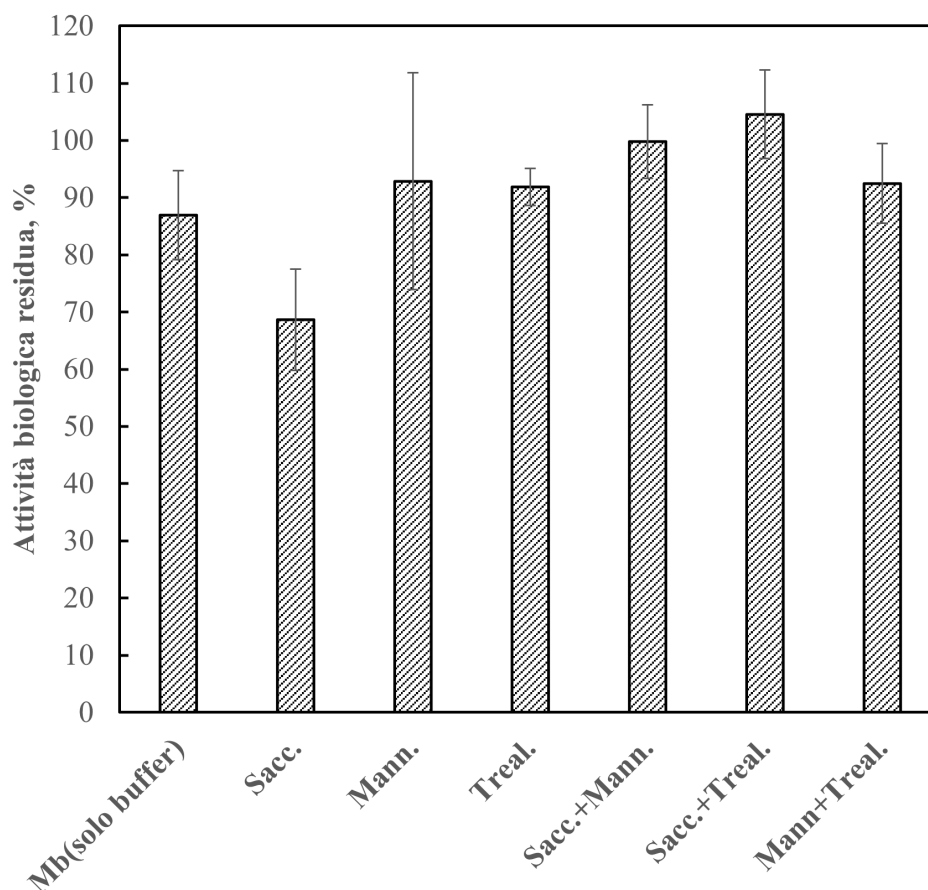


Figura 3.19: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di atomizzazione. Risultati ottenuti sfruttando i massimi valori di assorbanza, relativi all'ABTS ossidato, raggiunti entro un tempo di analisi di 30 minuti.

Effetto dell'aggiunta tensioattivo nella fase di atomizzazione

I risultati ottenuti a seguito del processo di atomizzazione sulle medesime formulazioni descritte precedentemente ma con in aggiunta il tensioattivo Tween 80 allo 0.01% in peso sono mostrati nella Figura 3.20. Essi sono presentati mediante un confronto con i risultati raggiunti in assenza del tensioattivo.

L'aggiunta di Tween 80 alle formulazioni processate mostra, in generale, con la sola esclusione della formulazione contenente mannitolo e trealosio, un incremento del valore medio dell'attività biologica residua. Tuttavia, confrontando quanto ottenuto per la mioglobina nel solo buffer citrato in presenza del tensioattivo con la medesima soluzione in assenza di quest'ultimo, si evince che, a causa dell'elevata variabilità dei risultati, sussista una parziale sovrapposizione dell'intervallo dei valori ricavati. Di conseguenza, non è possibile affermare con certezza che la presenza del solo Tween 80, in aggiunta alla soluzione in assenza di eccipienti, comporti un effettivo incremento dell'attività biologica residua. Ciononostante, un aumento tangibile di tale valore si rende evidente nel momento in cui la soluzione contenente mioglobina nel solo buffer in presenza del tensioattivo viene ad essere comparata con le formulazioni contenenti Tween 80 di mannitolo, saccarosio più trealosio e saccarosio più mannitolo. Per queste ultime, infatti, l'azione del tensioattivo sembrerebbe essere agevolata. In tutti gli altri casi le formulazioni in presenza di Tween 80 sembrano mostrare un comportamento analogo a quello della soluzione di Mb nel solo

buffer citrato contenente il tensioattivo. Tutte le formulazioni comprendenti saccarosio sembrano beneficiare della presenza del Tween 80. Per ognuna di esse, infatti, vi è stato un incremento non trascurabile dell'attività biologica residua rispetto al caso delle medesime formulazioni in assenza del tensioattivo.

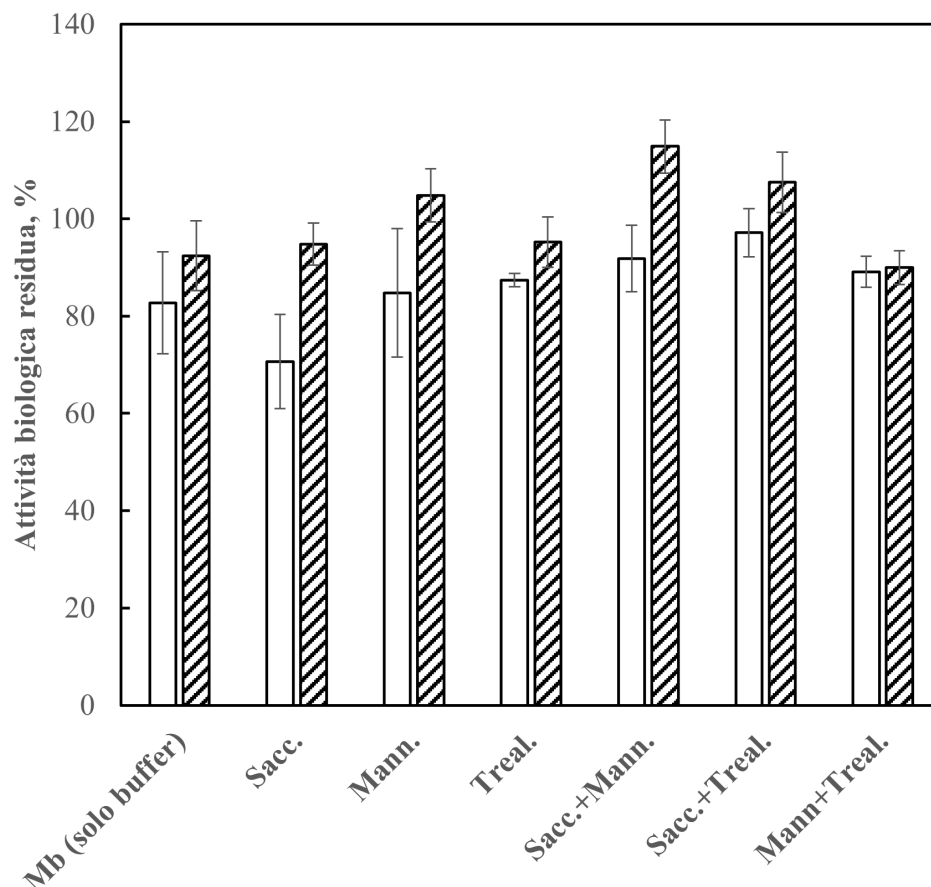


Figura 3.20: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito della fase di atomizzazione in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) del tensioattivo Tween 80. Risultati ottenuti per un tempo di analisi di 9 minuti.

3.2.2 Impatto del congelamento/scongelo sull'attività biologica

Successivamente alla valutazione della fase di atomizzazione, si è passati a studiare l'impatto della fase di congelamento/scongelo sull'attività biologica della proteina in esame. Le metodologie e gli strumenti impiegati per la prova sono riportati nel § 2.2.3, le formulazioni oggetto dello studio sono le medesime valutate al precedente punto.

Consultando quanto presente in letteratura, si rende evidente come, nel caso in cui la mioglobina vada incontro ad un processo di congelamento/scongelo impiegando un pH acido, il meccanismo controllante la perdita di attività sia legato ad una sua elevata sensibilità alla denaturazione a freddo [3]. Nelle condizioni operative adottate nelle analisi qui presentate, l'impiego di un pH pari a 6.5 non permette di poter affermare ciò. Per tale motivo bisogna considerare che ulteriori meccanismi di denaturazione e possibile aggregazione si rendano evidenti. Tra essi si può presumere che l'adsorbimento della proteina all'interfaccia acqua-ghiaccio possa essere il principale promotore di una perdita

dell'attività biologica. Tale considerazione nasce dal fatto che velocità di raffreddamento elevate, come quelle a cui in questo caso vanno incontro le differenti formulazioni, possono:

- potenzialmente prevenire la cristallizzazione del buffer favorendo la conservazione del pH della soluzione [1, 3];
- portare alla formazione di un maggior numero di cristalli aventi una più piccola dimensione (dunque una maggiore interfaccia acqua-giacchio) se comparata ad un congelamento lento della medesima formulazione, come posto in evidenza in § 1.2.1;
- ridurre la possibile cristallizzazione di soluti che per un congelamento lento portano alla formazione di una fase cristallina, ad esempio, il mannitolo [3];
- potenzialmente sfavorire le separazioni di fase.

Effetto degli eccipienti nella fase di congelamento/scongelo

La Figura 3.21 mostra i risultati ottenuti a seguito della fase di congelamento/scongelo dopo un tempo di osservazione di 9 minuti. Essa evidenzia come la presenza di eccipienti risulti fondamentale per la preservazione dell'attività biologica della proteina. I risultati peggiori, infatti, sono stati ottenuti con la mioglobina presente nel solo buffer citrato in assenza di agenti protettivi. Rispetto al caso della sola atomizzazione, precedentemente discusso, è possibile osservare come la fase di congelamento/scongelo risulti essere maggiormente gravosa per il principio attivo. Ponendo attenzione sulla formulazione contenente il solo mannitolo, è interessante notare come, seppur presenti una percentuale di attività biologica residua media minore rispetto alle formulazioni contenenti i soli disaccaridi, il suo comportamento non se ne discosta fortemente. Tale risultato lascia presumere che l'elevata rapidità con cui avvenga il congelamento abbia permesso solo una parziale cristallizzazione del soluto. Di conseguenza, l'effetto negativo di una cristallizzazione dell'eccipiente con la formazione di un'ulteriore interfaccia sulla quale la proteina può adsorbirsi ne è risultato limitato. Il trealosio mostra delle prestazioni di poco superiori in questa fase rispetto a quelle esplicitate dal solo saccarosio. Ad ogni modo, i risultati di attività biologica residua migliori sono stati ottenuti nei casi in cui nella soluzione sia presente uno dei due disaccaridi valutati o nel momento in cui essi siano compresenti. Diversamente da quanto atteso, le formulazioni contenenti saccarosio e mannitolo o trealosio e mannitolo non hanno mostrato un incremento nel recupero dell'attività biologica della proteina rispetto al campione contenente il solo composto poliolico. In particolare, per la formulazione contenente saccarosio e mannitolo, la presenza di quest'ultimo sembra limitare fortemente le capacità protettive del disaccaride. Non è possibile affermare lo stesso per la soluzione contenente trealosio e mannitolo data l'elevata variabilità dei risultati, come evidenziato in figura dalla barra d'errore, per tale campione.

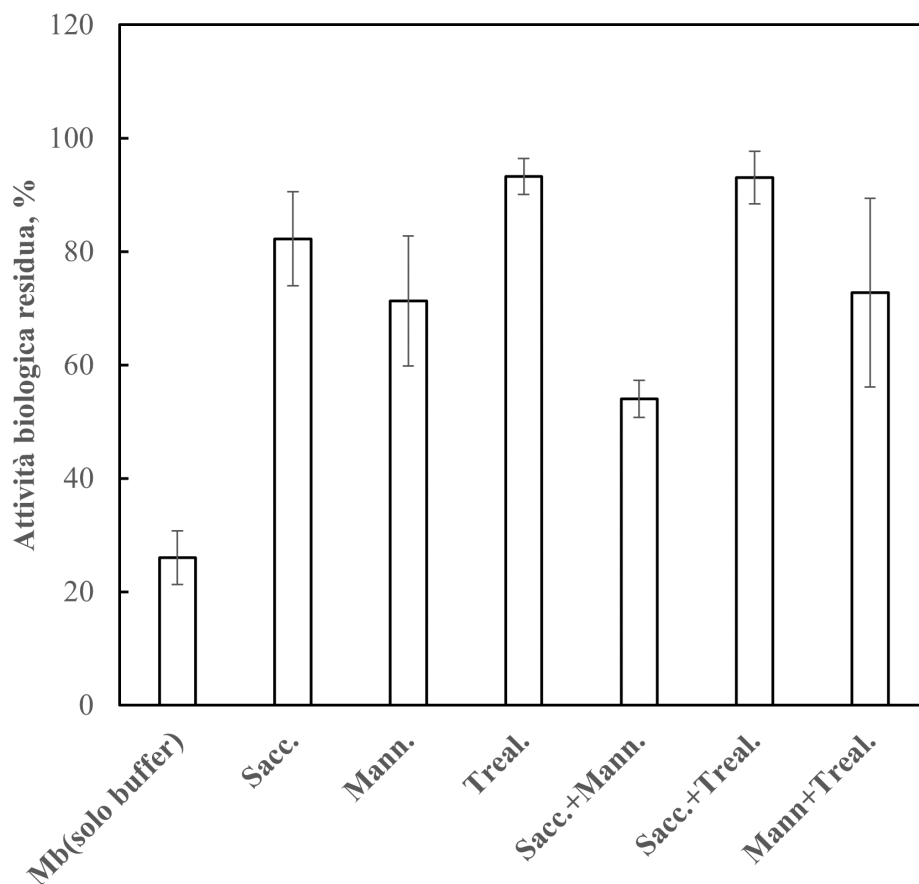


Figura 3.21: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito di un ciclo di congelamento (operato mediante l'uso di azoto liquido) e scongelamento (in aria a temperatura ambiente) in assenza di Tween 80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.

Effetto dell'aggiunta del tensioattivo nella fase di congelamento/scongela-

mento

Nella Figura 3.22 sono riportati i risultati ottenuti a seguito dell'aggiunta del tensioattivo, Tween 80 allo 0.01 % in peso, per la fase di congelamento/scongela-

mento. Dal grafico è possibile osservare come l'aggiunta del polisorbato 80 risulti avere un effetto di notevole incremento dell'attività biologica residua nel caso della mioglobina presente nel solo buffer citrato. Soffermandosi su tale risultato, per il quale il valore dell'attività biologica residua non è influenzato dalla presenza di ulteriori eccipienti se non dal tensioattivo, si può ben comprendere come il possibile adsorbimento all'interfaccia acqua-ghiaccio possa effettivamente essere il principale meccanismo di denaturazione proteica nel corso della fase in esame. L'aggiunta del Tween 80, infatti, in grado di disporsi all'interfaccia limitandone l'interazione con la proteina, determina un incremento del recupero, se comparata al caso della mioglobina in solo buffer in sua assenza, di oltre il 50%. Attraverso un confronto con i dati ottenuti in assenza di Tween 80 è possibile osservare che l'azione di quest'ultimo risulta evidente nel momento in cui si valutano formulazioni contenenti saccarosio e mannitolo. Tuttavia, quando si pone attenzione ai risultati ottenuti per formulazioni contenenti trealosio, ad esclusione del caso in cui esso sia presente in soluzione con il saccarosio, l'effetto del tensioattivo sembrerebbe lievemente inferiore. È infatti

possibile osservare come, per le formulazioni di solo trealosio o trealosio e mannitolo, non si evinca alcun incremento notevole di attività biologica residua sia nel momento in cui si compari tali formulazioni con le medesime in assenza di tensioattivo, sia se le si confronti con la solo mioglobina in buffer citrato in presenza di Tween 80. Le migliori prestazioni presentate dalla formulazione contenente il solo mannitolo rispetto al caso della stessa in assenza di tensioattivo potrebbero essere dovute alla capacità di quest'ultimo di limitare i danni dovuti ad una parziale cristallizzazione del soluto. Tale formulazione, infatti, contrariamente a quanto atteso, presenta una percentuale di attività biologica residua del tutto analoga a quella ottenuta con il solo saccarosio. Contrariamente al caso in assenza di Tween 80, la formulazione contenente saccarosio e mannitolo mostra delle percentuali di attività biologica residua molto elevate. L'andamento presente in figura permette di osservare l'effettiva efficacia protettiva delle formulazioni contenenti saccarosio in presenza di tensioattivo.

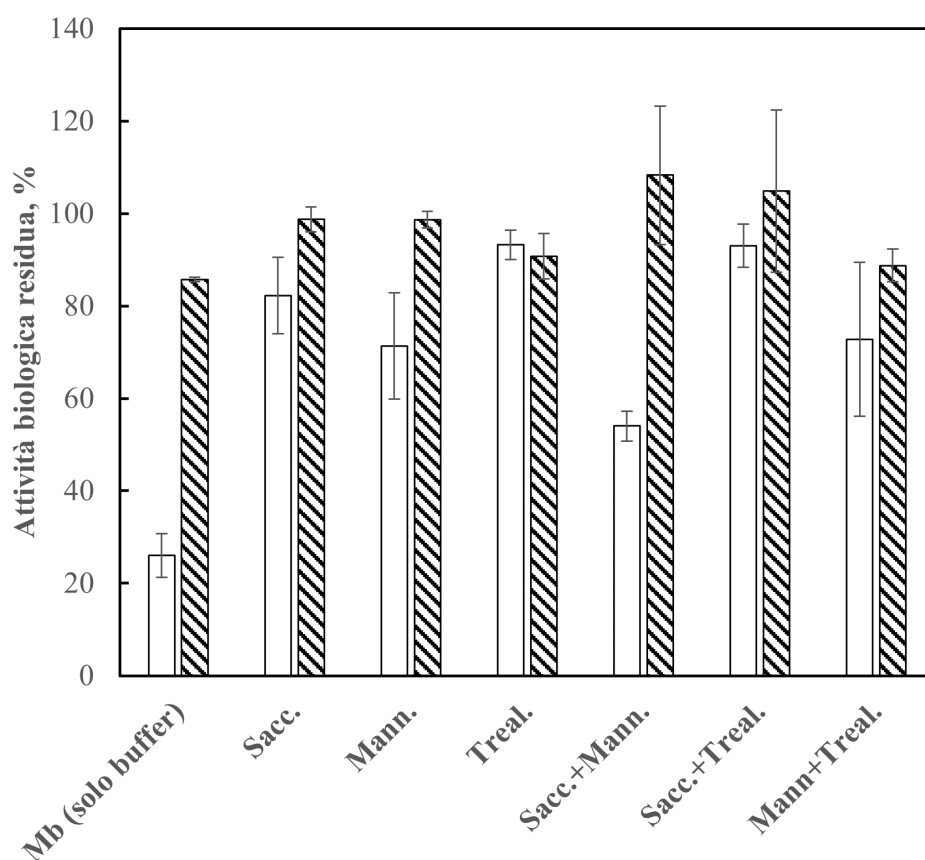


Figura 3.22: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito di un ciclo di congelamento (operato mediante l'uso di azoto liquido) e scongelamento (in aria a temperatura ambiente) in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) di Tween 80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.

3.2.3 Impatto dell'essiccamento sull'attività biologica

Le analisi riportate nella seguente § sono state ottenute a seguito di un ciclo completo di spray freeze-drying. Lo scopo della prova condotta è stato quello di osservare l'impatto che la fase di essiccamento ha sulla proteina accoppiata con i differenti eccipienti. Il

protocollo impiegato per l'ottenimento del prodotto anidro è descritto in dettaglio in § 2.3.

Effetto degli eccipienti in assenza di tensioattivo nella fase di essiccamento

I risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 3.23. Essa fa riferimento a quanto ottenuto a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.

Nel diagramma si osserva come la mioglobina nel solo buffer risulti del tutto scomparsa a seguito della fase di essiccamento. La presenza di eccipienti, i quali fungono in questo caso da lioprotettori, risulta fondamentale per riuscire a preservare almeno parte dell'attività biologica della proteina. Tuttavia, in generale, le percentuali di recupero si mostrano tutte piuttosto basse. Escludendo la soluzione contenente la mioglobina nel solo buffer citrato, le peggiori prestazioni sono state ottenute dalla formulazione con il solo mannitolo. Tale risultato può presumibilmente essere legato a due differenti motivi: l'incapacità di quest'ultimo di contrastare in maniera efficace la disidratazione e una sua possibile cristallizzazione. Nel primo caso, infatti, risulta essere nota la minore capacità del mannitolo di sostituirsi all'acqua nella formazione di legami a idrogeno con i residui amminioacidici (water replacement) rispetto al saccarosio e al trealosio [27]. Ciò comporta una maggiore possibilità di disidratazione della proteina e una sua conseguente denaturazione. Nel secondo caso, invece, mentre i disaccaridi sono in grado di allontanare le proteine e di ridurne la mobilità attraverso un meccanismo di vetrificazione, il mannitolo potrebbe cristallizzare durante il processo di essiccamento offrendo una nuova interfaccia sulla quale la proteina può adsorbirsi e denaturarsi [24]. Tali considerazioni sono supportate dal fatto che la compresenza del mannitolo con un disaccaride risulta incrementarne le prestazioni. Tutte le formulazioni contenenti saccarosio e trealosio mostrano una attività biologica residua analoga. Non sembra esservi, dunque, un effetto sinergico legato alla compresenza dei due disaccaridi. Contrariamente a quanto atteso, la formulazione contenente saccarosio e mannitolo ha mostrato le percentuali di attività biologica residua più elevate.

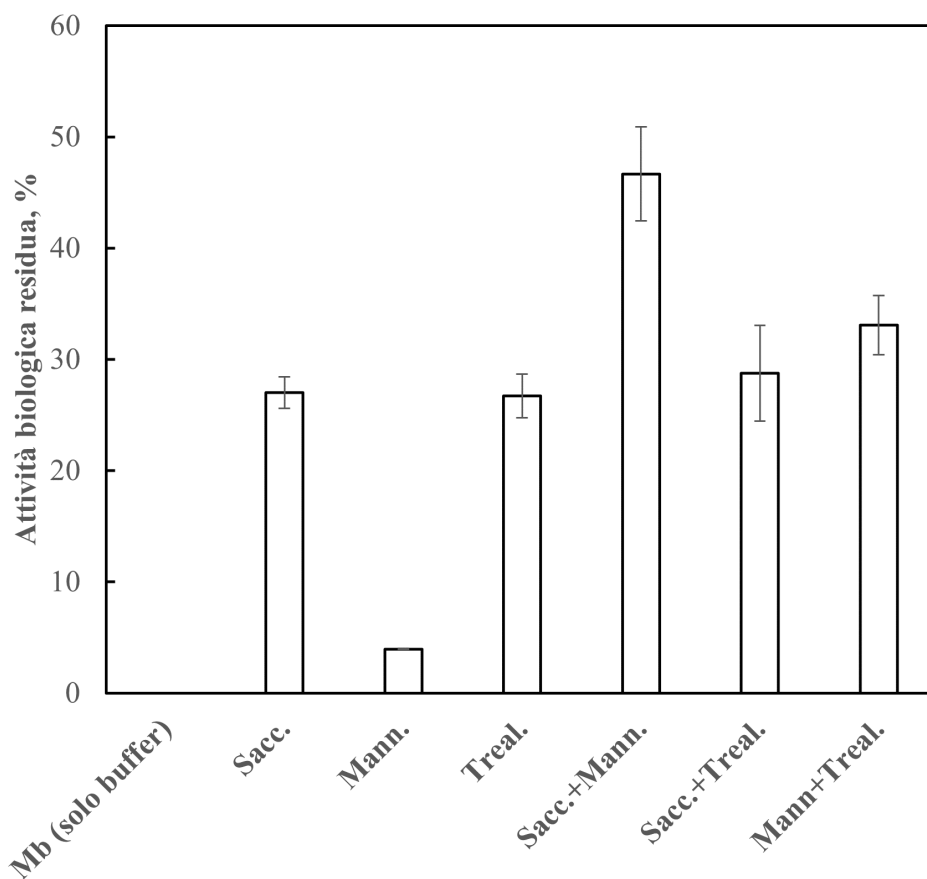


Figura 3.23: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di essiccamento, in assenza del tensioattivo. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.

Effetto dell'aggiunta del tensioattivo nella fase di essiccamento

Nella Figura 3.24 sono mostrati risultati ottenuti a seguito della fase di essiccamento nel momento in cui alle formulazioni è aggiunto il Tween 80 comparati con quelli ricavati in sua assenza.

Da un confronto dell'attività biologica residua ottenuta in presenza ed in assenza del tensioattivo per la mioglobina nel solo buffer, si rende evidente come il ruolo del Tween 80 risulti fondamentale per la preservazione dell'attività biologica nel corso del processo. Dal diagramma, inoltre, è possibile notare come l'effetto del tensioattivo risulti positivo per tutte le formulazioni valutate. I risultati ottenuti, dunque, lasciano intuire che la principale fonte di denaturazione della proteina sia il suo possibile adsorbimento alle differenti interfacce che vengono a crearsi nel decorso dell'intero processo. L'attività biologica preservata dalle formulazioni in presenza di Tween 80, come osservato anche nella prova in sua assenza, risulta incrementarsi nel caso in cui la mioglobina non sia presente nel solo buffer ma vengano aggiunti degli eccipienti. Essi, infatti, attraverso dei meccanismi di water replacement, vetrificazione e water entrapment, possono operare in maniera più o meno marcata in sinergia con il tensioattivo. In analogia con quanto valutato a seguito della prova di congelamento/scongelo, le formulazioni contenenti saccarosio in presenza di Tween 80 mostrano le prestazioni migliori. Il trealosio, invece, sembrerebbe meno propenso ad agire in sinergia con il tensioattivo rispetto a quanto fatto dal

saccarosio. Ciò lo si nota sia osservando l'evidente differenza di attività biologica residua della formulazione contenente il solo trealosio rispetto a quelle contenenti l'altro disaccaride, sia dalle prestazioni presentate dalla formulazione contenete trealosio più mannitolo, la quale, risulta mostrare i risultati peggiori rispetto a tutte le altre casistiche valutate. La formulazione contenente mannitolo mostra un notevole incremento dell'attività biologica residua in presenza del Tween 80 rispetto a quanto ottenuto con la medesima formulazione in sua assenza. Come precedentemente enunciato, infatti, tale soluto potrebbe cristallizzare durante la fase di essiccamento ed offrire un'ulteriore interfaccia sulla quale la proteina potrebbe adsorbirsi. La presenza del tensioattivo sembra ridurre notevolmente una possibile denaturazione causata da tale fenomeno.

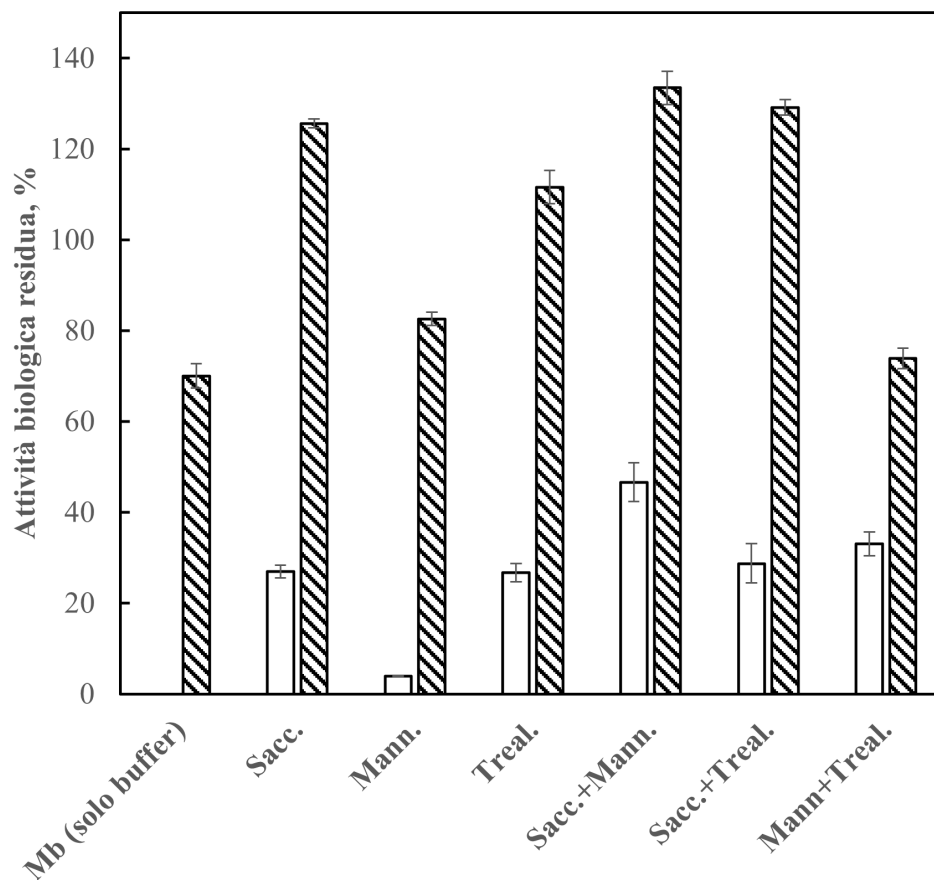


Figura 3.24: Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di essiccamento in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) di Tween80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.

Capitolo 4

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata studiata la tecnica dello spray freeze-drying. In particolare, è stato valutato l'impatto delle operazioni unitarie che la compongono (atomizzazione, congelamento e essiccamento) sull'attività biologica della mioglobina (proteina campione) e il ruolo di opportuni eccipienti nel favorirne la preservazione.

Al fine di individuare le fasi maggiormente critiche dello SFD per l'attività biologica della proteina modello adoperata e studiare le capacità protettive degli eccipienti nei confronti degli stress introdotti da tale tecnica di essiccamento, sono state svolte delle prove sperimentali facendo uso di soluzioni di mioglobina in buffer citrato (10 mM) a pH 6.5 in presenza di saccarosio, trealosio e mannitolo, al 5% in peso, con e senza tensioattivo (Tween 80) allo 0.01 % in peso.

L'atomizzazione è stata condotta per mezzo di un atomizzatore ad ultrasuoni (Büchi Labortechnik AG, Switzerland). Il congelamento è stato operato attraverso la tecnica dello spray freezing into vapor over liquid facendo uso di azoto liquido, mentre, lo scongelamento è stato svolto in aria a temperatura ambiente.

Per analizzare i risultati con una adeguata sensibilità, è stato sviluppato un protocollo basato sulla capacità della mioglobina di catalizzare la reazione di ossidazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) in presenza di perossido di idrogeno.

I risultati ottenuti dalle prove sperimentali hanno posto in evidenza come la fase di atomizzazione risulti essere la meno critica del processo. Essa, infatti, se comparata al congelamento e all'essiccamento, risulta ridurre l'attività biologica di una quantità esigua. Durante questa fase il ruolo degli eccipienti è risultato marginale; tutte le formulazioni hanno presentato un recupero dell'attività biologica molto simile a quello della soluzione di mioglobina nel solo buffer citrato.

Le fasi di congelamento/scongelamento ed essiccamento hanno mostrato un ruolo importante nella perdita dell'attività biologica. I risultati ottenuti a seguito di tali fasi, in accordo con quanto atteso, hanno evidenziato come la presenza di saccarosio, trealosio e mannitolo in soluzione, risulti fondamentale per la protezione della proteina dagli stress che esse stesse producono. In entrambe le fasi le formulazioni contenenti saccarosio, trealosio o entrambi, come da aspettative, hanno mostrato delle prestazioni migliori rispetto alla formulazione contenente il solo mannitolo. Ciò risulta essere legato ad una parziale cristallizzazione di tale soluto nella fase di congelamento e a un'ulteriore cristallizzazione nella fase di essiccamento. Le formulazioni contenenti saccarosio più mannitolo o trealosio più mannitolo hanno evidenziato un differente comportamento a seguito delle due fasi. Nella fase di congelamento/scongelamento, inaspettatamente, sembrerebbe prevalere un effetto deleterio legato alla presenza del mannitolo che parzialmente cristallizza. A seguito

della fase di essiccamento, invece, in conformità con le aspettative, la presenza dei disaccaridi in soluzione fornisce un notevole incremento delle prestazioni di tali formulazioni se comparate alla formulazione contenente il solo composto poliolic.

L'aggiunta del tensioattivo alle formulazioni processate ha mostrato come questo abbia un effetto benefico sulla preservazione dell'attività biologica. Ciò è risultato molto evidente a seguito delle fasi di congelamento/scongelo e essiccamento. L'attività biologica residua della mioglobina nel solo buffer, infatti, risulta incrementarsi notevolmente in presenza del Tween 80. Tale osservazione ha avvalorato l'ipotesi che, per le condizioni operative adoperate, la causa principale della denaturazione della mioglobina nel corso dello spray freeze-drying fosse legata alle elevate superfici di interfaccia che vengono a generarsi nel corso del processo. Ulteriore conferma è stata fornita dall'incremento dell'attività biologica residua ottenuta per le formulazioni contenenti il solo mannitolo a seguito delle fasi di congelamento/scongelo e essiccamento. In tali fasi, infatti, il soluto può cristallizzare portando alla formazione di una nuova interfaccia sulle quali la proteina può adsorbirsi e denaturarsi. In presenza del tensioattivo tale effetto negativo si riduce fortemente. È stato inoltre osservato che in presenza del Tween 80 le prestazioni migliori siano ottenute nel momento in cui in soluzione è presente il saccarosio.

In conclusione, la mioglobina, alle condizioni adoperate, mostra un'elevata tendenza a denaturarsi a causa di un adsorbimento alle interfacce che si generano nel corso dello spray freeze-drying. Particolarmente critiche risultano le fasi di congelamento ed essiccamento. L'atomizzazione, invece, seppur favorisca la nascita di elevate superfici di interfaccia gassoso-liquido, non sembra causare grandi problemi. La presenza di eccipienti nelle fasi definite critiche dello SFD si mostra fondamentale per la preservazione dell'attività biologica. Le formulazioni contenenti i disaccaridi mostrano quasi sempre il comportamento migliore, mentre, nel momento in cui il mannitolo è presente da solo in soluzione, possono verificarsi problemi legati ad una sua possibile cristallizzazione. L'uso del tensioattivo ha un forte effetto benefico sul recupero dell'attività biologica soprattutto se lo si utilizza in presenza di saccarosio.

Di particolare interesse per il futuro potrebbe essere la conduzione delle prove eseguite mediante l'uso di differenti tecniche di atomizzazione, andando ad osservare se l'impatto di tale fase dello SFD sull'attività biologica risulti essere sempre esigua o se sia più o meno marcata a seconda del tipo di ugello impiegato, della potenza adoperata per l'esecuzione dell'atomizzazione e della portata volumetrica alimentata all'atomizzatore. In aggiunta, avendo osservato come le fasi di congelamento e essiccamento risultino quelle di maggiore impatto sull'attività biologica della proteina processata, attraverso un loro miglioramento e valutando l'uso di ulteriori eccipienti in aggiunta a quelli qui studiati si potrebbe giungere ad un'ottimizzazione del processo di spray freeze-drying.

Elenco dei simboli

P_c	Pressione in camera
P_{ice}	Tensione di vapore del prodotto congelato
T_c	Temperatura di collasso
T_g	Temperatura di transizione vetrosa
T_{eu}	Temperatura eutettica
T_n	Temperatura di nucleazione

Abbreviazioni

SFD	Spray Freeze-Drying	1
FD	Freeze Drying	1
SD	Spray Drying	9
SFV	Spray Freezing into Vapor	12
SFL	Spray Freezing into Liquid	12
SFV/L	Spray Freezing into Vapor over Liquid	12
Mb	Mioglobina	17
ABTS	acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)	17

Elenco delle figure

1.1	Diagramma di stato dell'acqua contenente gli fase di liofilizzazione. Figura tratta da [14] con modifiche.	4
1.2	Schema tipico di un liofilizzatore con i suoi componenti principali. Figura tratta da [28].	5
1.3	Esempio di un tipico profilo di temperatura durante il congelamento. Figura tratta da [4] con modifiche.	7
1.4	Variazione dell'energia libera di Gibbs in funzione del raggio del cluster. Figura tratta da [39] con modifiche.	8
1.5	Rappresentazione schematica di un processo di spray freeze drying dinamico con una rimozione in continuo del prodotto liofilizzato. Figura tratta da [1] con modifiche.	13
1.6	Andamento del $\Delta G_{unfolding}$ in funzione della temperatura. Figura tratta da [29] con modifiche.	14
2.1	(a) Struttura tridimensionale della Mioglobina (Mb). (b) Gruppo eme presente nella mioglobina che ne rende possibile l'attività catalitica nei confronti dell'ABTS in presenza di perossido di idrogeno.	17
2.2	Differenti colorazioni delle soluzioni contenenti ABTS ⁺ , da sinistra a destra, concentrazione crescente.	18
2.3	Fotografia che mostra gli strumenti adoperati per l'esecuzione delle prove di spray freezing	23
2.4	Fotografia rappresentante lo spray di una formulazione mediante atomizzatore ad ultrasuoni in un flacone contenente azoto liquido sul fondo. Tecnica SFV/L.	24
2.5	Liofilizzatore LyoBeta Telstar, utilizzato per le prove sperimentali di essiccamento.	25
3.1	Spettro di assorbanza dell'ABTS non reagito (in arancione) e dell'ABTS ossidato (in azzurro) per lunghezze d'onda che variano in un intervallo compreso tra i 300 nm ed i 900 nm. Le curve sono state ottenute entrambe impiegando una concentrazione di ABTS pari a 12.5 mM. Per l'ottenimento della curva in arancione non è stato utilizzato il perossido di idrogeno, contrariamente, per avere la reazione da cui è poi scaturita la curva di assorbimento in azzurro si è impiegato H_2O_2 con una concentrazione di 30 mM.	30

3.2	Spettro di assorbanza dell'ABTS non reagito (in arancione) e dell'ABTS ossidato (in azzurro) per lunghezze d'onda che variano in un intervallo compreso tra i 300 nm ed i 900 nm. Le curve sono state ottenute entrambe impiegando una concentrazione di ABTS pari a 3.125 mM. Per l'ottenimento della curva in arancione non è stato utilizzato il perossido di idrogeno, contrariamente, per avere la reazione da cui è poi scaturita la curva di assorbimento in azzurro si è impiegato H_2O_2 con una concentrazione di 37.5 mM.	31
3.3	Soluzione stock ABTS in buffer citrato 30 mM. La colorazione verde è sinonimo della presenza in soluzione del radicale cationico $ABTS^{\cdot+}$ frutto dell'ossidazione.	32
3.4	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari a 6.5 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.	33
3.5	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari a 7 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.	33
3.6	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 8 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C.	34
3.7	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 6.5 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione $0.1 \frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e $0.05 \frac{mg}{ml}$ (curva rossa).	35
3.8	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 7 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione $0.1 \frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e $0.05 \frac{mg}{ml}$ (curva rossa).	35
3.9	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per una soluzione di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, avente pH pari ad 8 e lasciata reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C in presenza di mioglobina in concentrazione $0.1 \frac{mg}{ml}$ (curva azzurra) e $0.05 \frac{mg}{ml}$ (curva rossa).	36
3.10	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per soluzioni di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, aventi pH pari a 6.5 e lasciate reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C. Ogni soluzione presenta differenti concentrazioni di mioglobina, tali valori variano in un intervallo tra $15 \frac{\mu g}{ml}$ e $0.05 \frac{\mu g}{ml}$	37
3.11	Andamento dell'assorbanza a 420 nm per soluzioni di ABTS e H_2O_2 , alle rispettive concentrazioni di 10 mM e 5 mM, aventi pH pari a 6.5 e lasciate reagire per un tempo di 30 minuti alla temperatura di 25°C. Ogni soluzione presenta differenti concentrazioni di mioglobina, tali valori variano in un intervallo tra $200 \frac{ng}{ml}$ e $10 \frac{ng}{ml}$	38
3.12	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito della fase di essiccamento in assenza di tensioattivo.	39

3.13	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di essiccamento in presenza di Tween80.	40
3.14	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di atomizzazione in assenza del tensioattivo.	40
3.15	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di atomizzazione in presenza del tensioattivo.	41
3.16	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di congelamento/scongelo in assenza di Tween80.	41
3.17	Andamento delle assorbanze per le differenti formulazioni risultanti dalle analisi condotte a seguito dello fase di congelamento/scongelo in presenza di Tween80.	42
3.18	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito della fase di atomizzazione. Risultati ottenuti per un tempo di analisi di 9 minuti. . .	43
3.19	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di atomizzazione. Risultati ottenuti sfruttando i massimi valori di assorbanza, relativi all'ABTS ossidato, raggiunti entro un tempo di analisi di 30 minuti.	44
3.20	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di atomizzazione in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) del tensioattivo Tween 80. Risultati ottenuti per un tempo di analisi di 9 minuti.	45
3.21	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito di un ciclo di congelamento (operato mediante l'uso di azoto liquido) e scongelamento (in aria a temperatura ambiente) in assenza di Tween 80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.	47
3.22	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito di un ciclo di congelamento (operato mediante l'uso di azoto liquido) e scongelamento (in aria a temperatura ambiente) in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) di Tween 80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.	48
3.23	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di essiccamento, in assenza del tensioattivo. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.	50
3.24	Attività biologica residua per le differenti formulazioni a seguito dello fase di essiccamento in assenza (barre vuote) ed in presenza (barre tratteggiate) di Tween80. Risultati ottenuti a seguito di un tempo di analisi di 9 minuti.	51

Elenco delle tabelle

2.1	Soluzione su cui è stata condotta l'analisi spettrofotometrica al fine di individuare la lunghezza d'onda a cui fosse possibile associare la forma ossidata dell'ABTS.	19
2.2	Riassunto delle caratteristiche delle soluzioni impiegate al fine di osservare l'effetto di differenti valori di pH sul decorso della reazione di ossidazione dell'ABTS.	20
2.3	Valori di concentrazione di mioglobina negli intervalli $[10-200] \frac{ng}{ml}$ e $[0.05-15] \frac{\mu g}{ml}$ impiegate al fine di osservare l'influenza di tale parametro sul decorso della reazione di ossidazione dell'ABTS.	21
2.4	Formulazioni impiegate per le prove di atomizzazione, congelamento/scongelamento ed essiccamento.	22
2.5	Protocollo impiegato nella prova di liofilizzazione.	26

Bibliografia

- [1] Adali, M. B., Barresi, A. A., Boccardo, G., & Pisano, R. (2020). Spray freeze-drying as a solution to continuous manufacturing of pharmaceutical products in bulk. *Processes*, 8(6), 709.
- [2] Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 307–326.
- [3] Arsiccio, A., Giorcello, P., Marengo, L., & Pisano, R. (2020). Considerations on protein stability during freezing and its impact on the freeze-drying cycle: a design space approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 464–475.
- [4] Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J. M., Gallegos, C. (2019). The importance of understanding the freezing fase and its impact on freeze-drying process performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378–1395.
- [5] Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., Pikal, M. J. (2007). Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5), 505–523.
- [6] Carlsen, C. U., Skovgaard, I. M., & Skibsted, L. H. (2003). Pseudoperoxidase activity of myoglobin: kinetics and mechanism of the peroxidase cycle of myoglobin with H₂O₂ and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5815–5823.
- [7] Chang, L. (., Pikal, M. J. (2009). Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 2886–2908.
- [8] Dare, N. A., & Egan, T. J. (2018). Heterogeneous catalysis with encapsulated haem and other synthetic porphyrins: Harnessing the power of porphyrins for oxidation reactions. *Open Chemistry*, 16(1), 763–789.
- [9] Domokos, András, et al. Integrated continuous pharmaceutical Technologies—A Review. *Organic Process Research Development*, vol. 25, n. 4, mar. 2021, pp. 721–39.
- [10] Eleni R. Understanding Peroxidase immobilisation on Bioinspired Silicas and application of the biocatalyst for dye removal. PhD thesis. University of Sheffield, 2019.
- [11] Emami, F., Vatanara, A., Park, E., & Na, D. (2018). Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 10(3), 131.

- [12] Fissore, D., Pisano, R., & Barresi, A. A. (2018). Process analytical technology for monitoring pharmaceuticals freeze-drying – A comprehensive review. *Drying Technology*, 36(15), 1839–1865.
- [13] GR.Nireesha¹, L.Divya, C.Sowmya, N.Venkateshan, M. Niranjan Babu & V.Lavakumar (2013). Lyophilization/freeze drying-an review. Available at: www.ijntps.org (ultimo accesso 19/11/2021).
- [14] Ishwarya, S. P., Anandharamakrishnan, C., & Stapley, A. G. F. (2015). Spray-freeze-drying: a novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science Technology*, 41(2), 161–181.
- [15] Kasper, J. C., & Friess, W. (2011). The freezing fase in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 248–263.
- [16] Kim, K.-y. (1959). Drop-size distributions from pneumatic atomizers.
- [17] Khairnar, S., Kini, R., Harwalker, M., Slaunkhe, K., & Chaudhari, S. (2013). A review on freeze drying process and pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 4(3), 76–94.
- [18] Lai, M. C., Topp, E. M. (1999). Solid [U+2010]state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(5), 489–500.
- [19] Liu, Y., Zhao, Y., & Feng, X. (2008). Exergy analysis for a freeze-drying process. *Applied Thermal Engineering*, 28(7), 675–690.
- [20] Maltesen, M. J., & van de Weert, M. (2008). Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5(2-3), Articolo e81-e88.
- [21] Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W., Katayama, D. S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 544–575.
- [22] Matteucci P. Sviluppo di un metodo elettrochimico per la determinazione della capacità antiossidante. Tesi di laurea magistrale in chimica industriale. Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, 2012.
- [23] Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 288–295.
- [24] Mutukuri, T. T., Wilson, N. E., Taylor, L. S., Topp, E. M., & Zhou, Q. T. (2021). Effects of drying method and excipient on the structure and physical stability of protein solids: freeze drying vs. spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 594, 120169.
- [25] Pisano, R., Fissore, D., Antonello, A. Heat Transfer in Freeze-Drying Apparatus. *In Developments in Heat Transfer*. InTech, 2011.

- [26] Pisano, R., Fissore, D., Barresi, A. A. (2012). Quality by design in the secondary drying fase of a freeze-drying process. *Drying Technology*, 30(11-12), 1307–1316.
- [27] Pisano, R. (2021). Appunti del corso di principi di biotecnologie farmaceutiche. Lezione 28. Formulazione di un prodotto farmaceutico.
- [28] Pisano, R. (2021). Appunti del corso di principi di biotecnologie farmaceutiche. Lezione 25. Liofilizzazione dei prodotti farmaceutici.
- [29] Rathore, N., Rajan, R. S. (2008). Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations. *Biotechnology Progress*, 24(3), 504–514.
- [30] Sadikoglu, H., Ozdemir, M., & Seker, M. (2006). Freeze-drying of pharmaceutical products: research and development needs. *Drying Technology*, 24(7), 849–861.
- [31] Sharma, A., Khamar, D., Cullen, S., Hayden, A., & Hughes, H. (2021). Innovative drying technologies for biopharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 121115.
- [32] Song, Y.-L., Bandi, L. (2020). Design and simulation of the new ultrasonic atomizer using silicon-based with one fase resonator. *Results in Physics*, 18, 103166.
- [33] Stratta, L., Capozzi, L. C., Franzino, S., & Pisano, R. (2020). Economic analysis of a freeze-drying cycle. *Processes*, 8(11), 1399.
- [34] Tang, X. (.,& Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 191–200.
- [35] Walters, R. H., Bhatnagar, B., Tchessalov, S., Izutsu, K.-I., Tsumoto, K., & Ohtake, S. (2014). Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(9), 2673–2695.
- [36] Wang, Q., Yang, X., Yang, X., Liu, F., & Wang, K. (2015). Visual detection of myoglobin via G-quadruplex DNAzyme functionalized gold nanoparticles-based colorimetric biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212, 440–445.
- [37] Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 1–60.
- [38] Wanning, S., Süverkrüp, R., Lamprecht, A. (2015). Pharmaceutical spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 488(1-2), 136–153.
- [39] <https://www.aub.edu.lb/msfea/research/Documents/CFD-Nucleation.pdf> (ultimo accesso 19/11/2021)

Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto il mio relatore, il Prof. Roberto Pisano, per la sua grande disponibilità, professionalità e gentilezza dimostratami durante lo svolgimento di questo lavoro di tesi. Ringrazio, inoltre, la correlatrice, la Dott.ssa Merve Betul Adali, per il grande aiuto fornitomi nello svolgimento delle prove sperimentali.

Un ringraziamento speciale è rivolto alla mia famiglia, mia madre Viola, mio padre Luciano, mio fratello Angelo e mia sorella Francesca per essermi stati vicino costantemente nel corso di questi anni universitari, per avermi supportato con affetto e permesso di portare a termine i miei studi. Un grazie speciale è rivolto anche a tutti i miei restanti parenti che, seppur lontani, non hanno mancato nel farmi sentire il loro sostegno.

Un ringraziamento in particolare lo rivolgo alla mia fidanzata Francesca per la sua presenza costante e amorevole. La ringrazio per avermi rivolto sorrisi e donato speranza nei momenti peggiori di questo percorso di studi e per avere sempre creduto nelle mie capacità.

Ringrazio immensamente i miei amici: Alessandro D., Antonio I.x2, Giuseppe V. e Luca C. Il loro sostegno ed aiuto è stato fondamentale per il raggiungimento di questo traguardo.

Concludo ringraziando i miei compagni universitari e tutte le persone incontrate nel corso di questi anni che in ogni modo hanno contribuito in maniera importante al raggiungimento della conclusione di questo percorso.