

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

## **Uso di un micro-liofilizzatore per il processo di liofilizzazione**



**Relatore**

prof. Davide Fissore

**Candidato**

Angelo Emiliano Ruggiero

Novembre 2018



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b> .....	1
1.1	Vantaggi del processo di liofilizzazione .....	2
1.2	Problemi di disomogeneità nei processi di liofilizzazione .....	3
1.2.1	Disomogeneità originata nella fase di congelamento .....	3
1.2.2	Disomogeneità originata nella fase di essiccamento primario .....	7
1.3	Determinazione della fine dell'essiccamento primario .....	9
1.3.1	Sensori di flusso di calore .....	11
1.4	Il MicroFD® e i micro-liofilizzatori.....	12
1.4.1	Mini-FD .....	12
1.4.2	Micro-FD .....	15
1.5	Analisi PLS .....	15
1.6	Scopo della Tesi .....	19
<b>2</b>	<b>Modello teorico e prove sperimentali</b> .....	21
2.1	Il liofilizzatore MicroFD®.....	21
2.1.1	LyoSim® .....	21
2.1.2	Accuflux® .....	21
2.1.3	Modalità <i>Analyze</i> .....	27
2.1.4	Modalità <i>Optimize</i> .....	29
2.2	Prove sperimentali.....	31
2.2.1	Struttura delle prove .....	33
2.3	Analisi PLS .....	36
<b>3</b>	<b>Risultati</b> .....	37
3.1	Temperatura del LyoSim® .....	37
3.2	Effetto del LyoSim® sul processo .....	40
3.2.1	Effetto disposizione termocoppie .....	44
3.3	Effetti dei parametri caratterizzanti il processo.....	46
3.3.1	Effetto temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario .....	47
3.3.2	Effetto della pressione della camera durante l'essiccamento primario .....	49
3.3.3	Nucleazione controllata .....	52
3.3.4	Effetto della velocità di raffreddamento .....	58
3.4	Analisi statistica .....	61
<b>4</b>	<b>Conclusioni</b> .....	75
<b>5</b>	<b>Lista dei Simboli</b> .....	79
<b>6</b>	<b>Bibliografia</b> .....	81

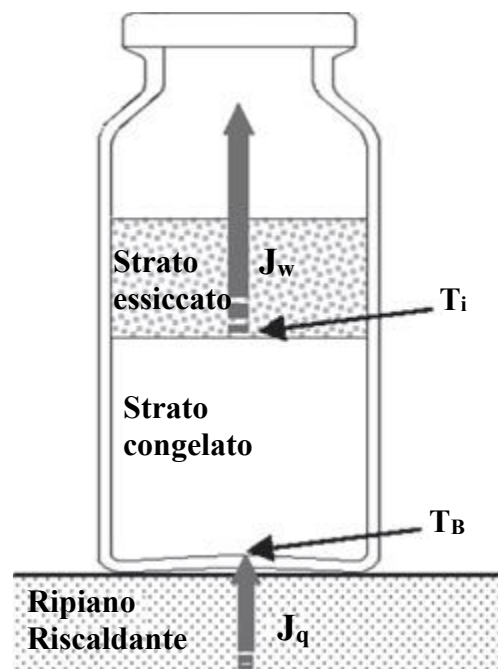


# 1 Introduzione

Per la conservazione degli alimenti, e soprattutto dei farmaci, uno dei processi più diffusi attualmente è la liofilizzazione, il cui scopo è quello di rimuovere da un prodotto congelato l'acqua in essa contenuta per sublimazione, limitando drasticamente il deterioramento della struttura e dei componenti della sostanza (Fissore *et al.*, 2018).

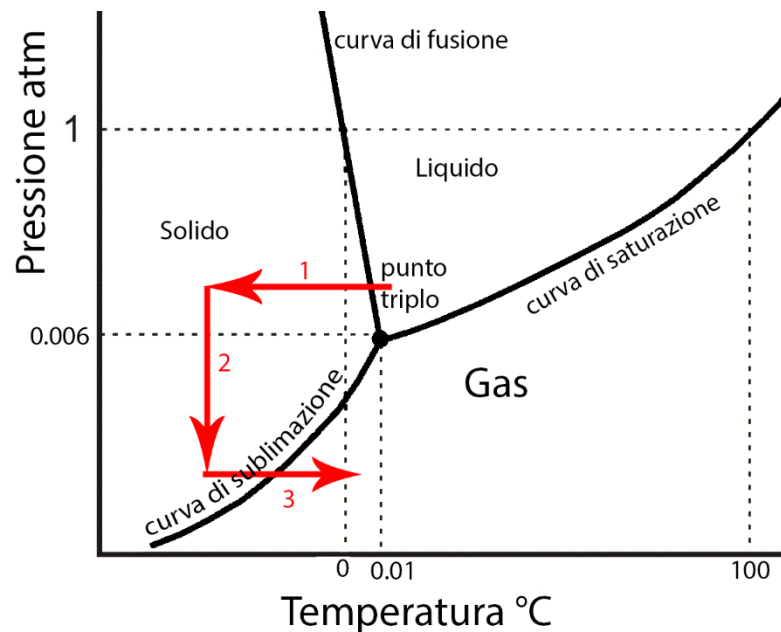
La liofilizzazione di un prodotto farmaceutico, generalmente costituito da una soluzione acquosa al cui interno è disciolto il principio attivo, è un processo composto da tre fasi:

1. congelamento della soluzione acquosa, in cui il prodotto raggiunge temperature tali da far congelare la soluzione. Durante questa fase non tutta l'acqua nella soluzione si trasforma allo stato solido: una parte di essa rimane allo stato liquido, ed è quella legata alle molecole del prodotto (Fissore *et al.*, 2018);
2. essiccamento primario, per rimuovere il ghiaccio per sublimazione, dove la temperatura è innalzata e la pressione abbassata rispetto ai valori utilizzati nella fase di congelamento. Durante questa fase, in seguito alla sublimazione dell'acqua si forma una struttura solida porosa nel prodotto, comunemente chiamata "cake" o "torta". Durante questa fase lo strato essiccato avanza dall'alto verso il fondo del flacone, come mostrato in Figura 1.1;
3. essiccamento secondario, che in seguito ad un ulteriore innalzamento di temperatura rispetto quella utilizzata per l'essiccamento primario, rimuove l'acqua adsorbita o non congelata.



**Figura 1.1** Stato del prodotto durante l'essiccamento primario. Sono evidenziati lo strato essiccato, lo strato ancora congelato, il flusso di calore  $J_q$ , il flusso di materia  $J_w$ , la temperatura all'interfaccia di sublimazione  $T_i$  e la temperatura del fondo del flacone  $T_B$ . Immagine tratta da Fissore (2013) e riprodotta con modifiche.

Per comprendere meglio cosa accade nel processo è sufficiente osservare il diagramma di fase dell'acqua proposto in Figura 1.2.



**Figura 1.2** Diagramma di fase dell'acqua. In figura sono state inserite rette per indicare le fasi della liofilizzazione. Le rette sono state posizionate in modo indicativo, e non sono indice delle condizioni effettivamente presenti durante il processo.

Il primo passo, ovvero il congelamento, è indicato con la retta “1”. All’inizio dell’essiccamento la pressione viene abbassata (retta “2”) e, in seguito, durante la fase dell’essiccamento primario, la temperatura del prodotto è innalzata (retta “3”). La fase dell’essiccamento secondario può seguire la retta 3 o divergere da essa (in quanto la pressione può non rimanere costante) per questo non è stata rappresentata.

### 1.1 Vantaggi del processo di liofilizzazione

La liofilizzazione è molto utilizzata in vari ambiti (farmaceutico e alimentare soprattutto) per via delle basse temperature coinvolte, in quanto, considerando l’ambiente farmaceutico, è possibile rimuovere l’acqua contenuta in una soluzione in cui è presente un principio attivo farmacologico, riducendone fortemente la cinetica delle reazioni chimiche e fisiche deterioranti il prodotto, quali possono essere idrolisi, ossidazione, isomerizzazione, etc. (Fissore, 2013).

Questo processo comporta vari vantaggi rispetto ad altre metodologie impiegabili per la preservazione di alimenti o farmaci (quali essiccamento e surgelazione). Tramite la liofilizzazione è infatti possibile conservare a temperatura ambiente i prodotti ottenuti, permettendone l’immagazzinamento in scaffali, ed è possibile una rapida reidratazione del prodotto. Inoltre, i prodotti liofilizzati, essendo più leggeri delle matrici iniziali, sono più facili da trasportare (Nireesha *et al.*, 2013).

Le condizioni operative scelte durante il processo (principalmente pressione e temperatura della camera e durata del processo) sono variabili e possono essere adattate a seconda dei risultati voluti, cioè della quantità d’acqua ammissibile (o desiderata) presente nel prodotto al termine del ciclo di liofilizzazione.

Durante il processo di liofilizzazione bisogna prestare attenzione alla temperatura scelta durante la fase di essiccamento primario, la quale deve essere tale da far sì che non si superino le temperature critiche del prodotto da essiccare, quali quelle che possono portare ad una denaturazione del prodotto, fusione dello stesso (nel caso di prodotti cristallini) o collasso della torta che si forma (nel caso di prodotti amorfi) (Oetjen e Haseley, 2004; Pikal, 1994). Il collasso della torta è dovuto al flusso viscoso della matrice vetrosa che accresce la densità della torta, portando all'occlusione dei pori e, quindi, all'aumento della resistenza al flusso di vapore, rallentando così la sublimazione e allungando la fase dell'essiccamento primario. Il collasso della torta può portare anche ad un aumento della quantità di acqua rimanente nel prodotto finale, a tempi di ricostruzione maggiore e, in alcuni casi, a perdita di attività del principio farmaceutico (Tsouroulfis *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 2004; Bellows e King, 1972; Adams e Iron, 1993).

## *1.2 Problemi di disomogeneità nei processi di liofilizzazione*

La liofilizzazione presenta alcune difficoltà, tutt'ora in fase di studio, che portano, in alcuni casi, ad ottenere risultati inattesi, che possono influenzare notevolmente la qualità del prodotto ottenuto.

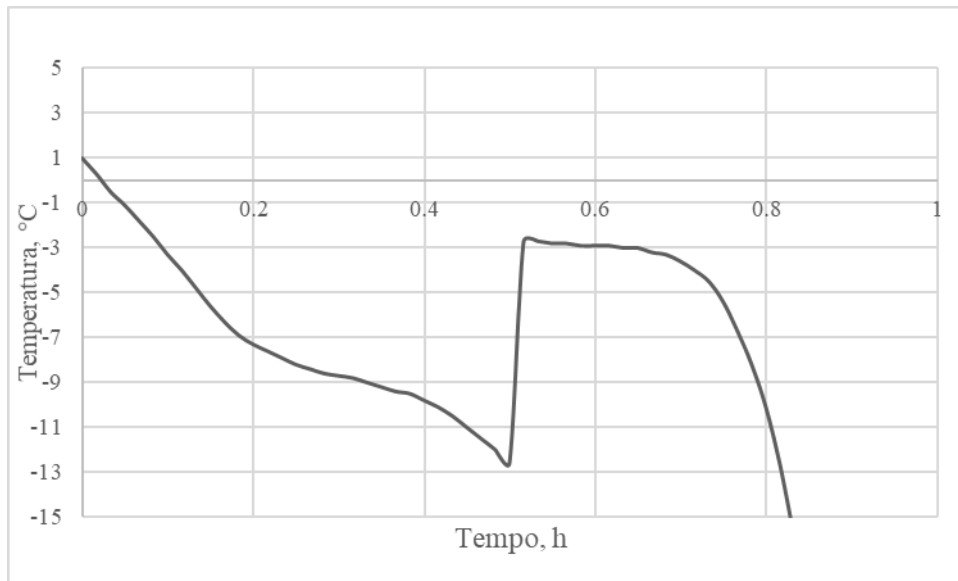
Il principale ostacolo che si riscontra durante un processo di liofilizzazione è la disomogeneità che si ottiene nel *batch*. Ciò che ne risulta è una diversa distribuzione della percentuale di acqua ancora presente nei singoli flaconi e di una diversa temperatura del prodotto durante la fase di essiccamento primario, la quale può anche essere responsabile della denaturazione del prodotto in alcuni flaconi.

Questi problemi possono portare, oltre a una qualità del prodotto non accettabile in alcuni flaconi, anche a una perdita economica, dovuta al dover scartare i flaconi che contengono al loro interno, per esempio, un prodotto denaturato, in cui il principio attivo, per un esempio in ambito farmaceutico, è andato danneggiato.

La disomogeneità nel *batch* può essere causata da vari fattori e in vari momenti del processo.

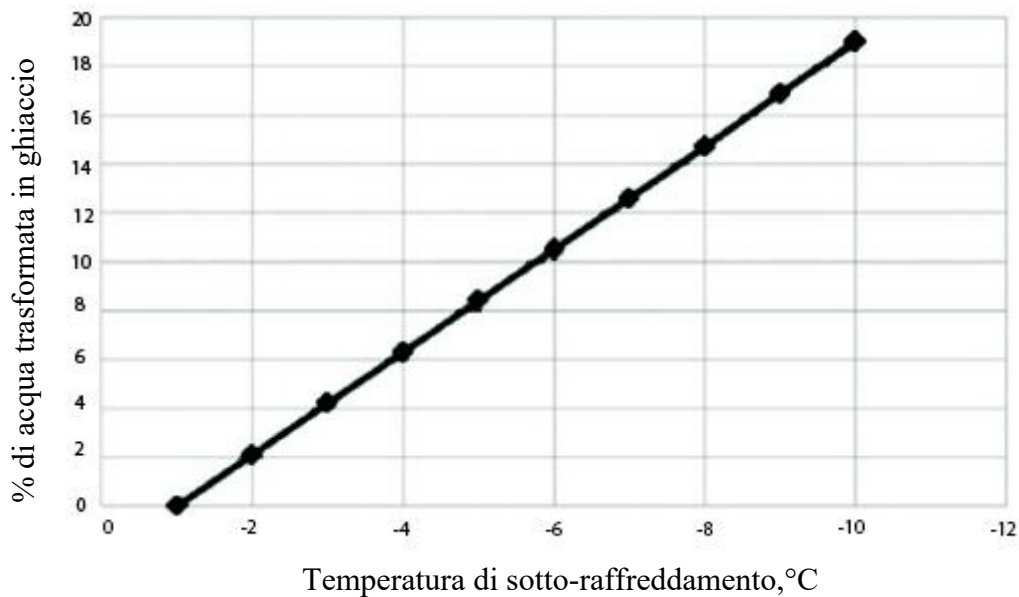
### *1.2.1 Disomogeneità originata nella fase di congelamento*

Quando la soluzione acquosa raggiunge una temperatura inferiore a quella di solidificazione essa diventa un liquido metastabile. La formazione di cristalli di ghiaccio avviene in seguito al fenomeno di nucleazione, ovvero di formazione di aggregati di molecole (nuclei) dal cui centro si propagano i cristalli e avviene il congelamento vero e proprio. L'intera soluzione non può ghiacciare immediatamente, in quanto l'acqua sottoraffreddata può assorbire solo 62,76 J/g delle 330,54 J/g di calore prodotte dalla formazione del ghiaccio, e ciò che ne risulta è un fenomeno esotermico (Patapoff e Overcashier, 2002). Pertanto, la propagazione del ghiaccio dal centro di nucleazione genera percorsi tortuosi e allo stesso tempo si osserva un incremento di temperatura del prodotto (Patapoff e Overcashier, 2002) In Figura 1.3 è evidenziato l'andamento della temperatura del prodotto in presenza di nucleazione.



**Figura 1.3** Andamento della temperatura di un flacone durante la fase di congelamento in presenza di nucleazione spontanea.

La quantità di acqua che cristallizza inizialmente dipende dal grado di sotto-raffreddamento. Solitamente tale quantità oscilla fra il 3% e il 19% dell'acqua totale (Thompson, 2013). A titolo d'esempio si mostra in Figura 1.4 la variazione della percentuale di acqua trasformata in ghiaccio al variare della temperatura di sotto-raffreddamento.



**Figura 1.4** Andamento della percentuale di acqua trasformata in ghiaccio al variare della temperatura di sotto-raffreddamento. Immagine tratta da Thompson (2013) con modifiche.

La quantità di ghiaccio iniziale in grado di propagarsi a partire dal centro di nucleazione è limitata dalla capacità della soluzione e del flacone di assorbire il calore latente di solidificazione generato dalla cristallizzazione dell'acqua. La crescita della quantità di ghiaccio comporta un rilascio di calore che innalza la temperatura del prodotto, cosa che ha come contro-effetto quello di rallentare significativamente la crescita degli stessi cristalli. Dopo la nucleazione,



la parte rimanente di acqua non congelata, che può essere anche pari al 97% (deducibile da Figura 1.4), inizia a cristallizzare in seguito alla successiva rimozione di calore dal flacone.

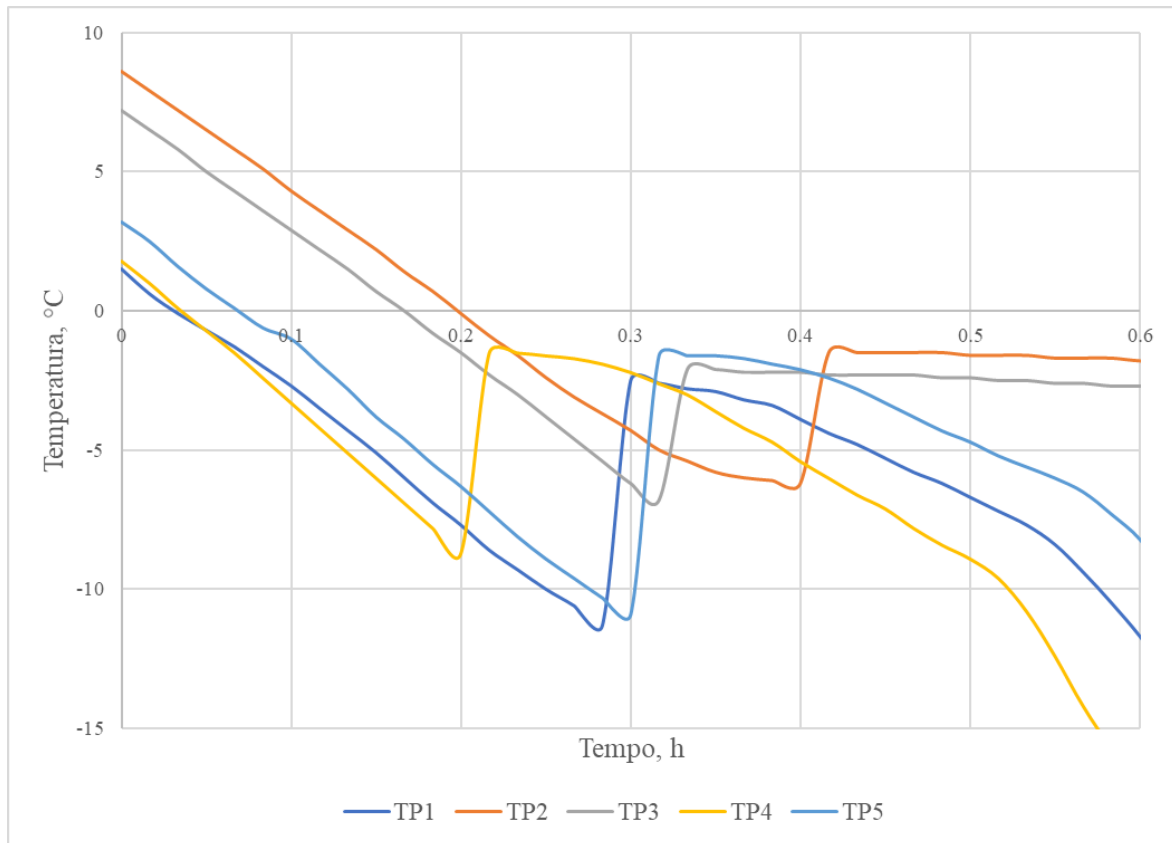
La temperatura a cui avviene la nucleazione è un parametro importante, in quanto si è dimostrato che per ogni grado centigrado in più a cui avviene la nucleazione si ha una riduzione della durata dell'essiccamento primario di circa il 3-4% (Searles *et al.*, 2001). Infatti, più il sotto-raffreddamento è spinto (quindi a temperature di nucleazione più basse) più i cristalli di ghiaccio che si formano saranno piccoli e, come conseguenza, si avrà una resistenza al trasferimento di massa durante la sublimazione superiore e, quindi, un aumento della durata dell'essiccamento primario (Patapoff e Overcashier, 2002).

Pertanto, le condizioni operative utilizzate in questo step influenzano fortemente ciò che avviene nell'essiccamento primario e secondario, in quanto influenzano le dimensioni dei cristalli che si vengono a formare. Più grandi sono i cristalli, più la "torta" che si forma durante l'essiccamento presenterà una superficie di scambio minore ed una maggiore porosità, che riduce la durata dell'essiccamento primario, in quanto il vapore che si libera durante la sublimazione incontrerà meno resistenza al crescere della porosità. Tuttavia, la durata dell'essiccamento secondario è aumentata, in quanto la minor superficie specifica della torta sfavorisce il desorbimento dell'acqua legata (Fissore, 2013).

Durante la fase di congelamento si manifesta una delle prime cause che possono portare disomogeneità all'interno del *batch*.

La nucleazione, infatti, non avviene contemporaneamente in tutte i flaconi, e questo comporta la formazione di cristalli di ghiaccio con diverse dimensioni. L'eterogeneità della nucleazione è, però, causata principalmente dai diversi gradi di sotto-raffreddamento dei flaconi nel *batch* più che dal momento in cui in ogni flacone avvenga il fenomeno di nucleazione. In alcuni flaconi la nucleazione avviene a  $-11^{\circ}\text{C}$ , in altri a  $-6^{\circ}\text{C}$ , etc. In sistemi sterili il prodotto nei flaconi può raggiungere anche un livello di sotto-raffreddamento molto più basso a causa dell'assenza di centri di nucleazione (Thompson, 2013). Ciò comporta che ogni flacone avrà un comportamento diverso durante l'essiccamento primario e quello secondario in seguito a ciò che la diversa dimensione dei cristalli comporta, descritta precedentemente.

In Figura 1.5 è mostrato il comportamento di cinque flaconi durante la fase iniziale del congelamento all'interno di uno stesso *batch*, seguendo l'andamento della loro temperatura tramite altrettante termocoppie.



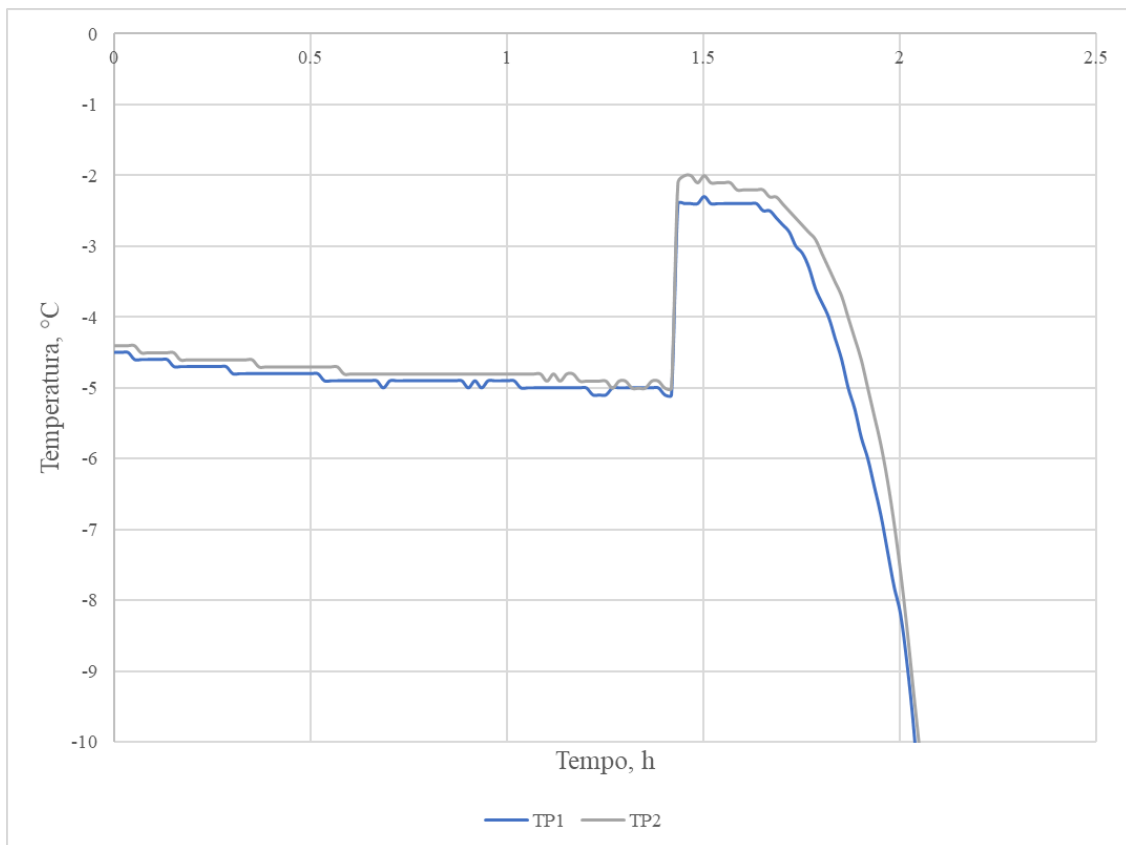
**Figura 1.5** Andamento della temperatura di cinque termocoppie durante la fase di congelamento in presenza di nucleazione spontanea

Come è possibile notare dalla Figura 1.5, la nucleazione avviene in intervalli di temperatura e di tempo differenti per ciascuna delle cinque termocoppie e ciascun fenomeno di nucleazione comporta un incremento rapido della temperatura del prodotto.

Una delle soluzioni principali a questo problema è il far nucleare contemporaneamente tutti i flaconi ad una determinata temperatura. In letteratura si trovano diverse possibili soluzioni per ottenere una nucleazione controllata. Due sono i metodi più utilizzati, la cui descrizione è stata tratta da Fissore (2013):

- Nebbia di ghiaccio, in cui, tramite l'ausilio di azoto a bassa temperatura e ad alta pressione (per esempio, 1 bar), si introducono cristalli nei flaconi con il liquido metastabile, che svolgono il ruolo di centri nucleazione; questa metodologia ha il risvolto negativo di poter presentare una distribuzione non omogenea del gas all'interno della camera di essiccazione, che può portare a una non omogeneità nel *batch*.
- Vibrazioni ultrasoniche, con frequenze superiori ai 10kHz, che causano la formazione di piccole bolle di gas che accrescendosi, collassano, producendo innalzamenti localizzati di temperatura e pressione, che comportano la nucleazione nei flaconi. Con questa metodologia si otterranno cristalli più grandi rispetto la nucleazione spontanea alle stesse condizioni di temperatura e pressione.

In Figura 1.6 è possibile osservare qual è l'andamento delle temperature all'interno dei flaconi in presenza di nucleazione controllata.



**Figura 1.6** Andamento della temperatura di due termocoppie durante la fase di congelamento in presenza di nucleazione controllata.

Il grafico presenta dati ottenuti da una prova effettuata durante questo lavoro di Tesi. La nucleazione controllata è stata ottenuta tramite il metodo della nebbia di ghiaccio. È possibile notare come la nucleazione avvenga contemporaneamente in tutti i flaconi monitorati dalle termocoppie.

Per concludere, esiste un'altra differenza fra la nucleazione spontanea e quella controllata, oltre la possibilità di determinare con quest'ultima la temperatura di nucleazione di tutti i flaconi. La differenza si ha nella propagazione del ghiaccio dalla posizione del centro di nucleazione. In una nucleazione spontanea il ghiaccio parte dal fondo del flacone e procede verso l'alto. Questo comporta che la velocità di formazione del ghiaccio decresce lungo il flacone, portando ad avere cristalli di ghiaccio più piccoli sul fondo e più grandi in testa (Thompson, 2013). Nella nucleazione spontanea, ottenuta tramite la metodologia della "nebbia di ghiaccio", la propagazione parte dall'alto del flacone avanzando verso il fondo.

### 1.2.2 Disomogeneità originata nella fase di essiccamento primario

L'essiccamento primario è la fase che segue il congelamento. In questo step si innalza la temperatura della camera e si abbassa la pressione. Essendo richiesta la sublimazione, cioè il passaggio diretto dallo stato solido a quello aeriforme, è necessario che, facendo riferimento al diagramma di fase dell'acqua (Figura 1.2) le condizioni di temperatura e pressione si trovino nella parte di grafico sottostante il punto triplo.

Nei processi di liofilizzazione farmaceutica si trattano soluzioni con soluti che possono influenzare i parametri caratteristici dell'acqua pura, come la temperatura di congelamento, a

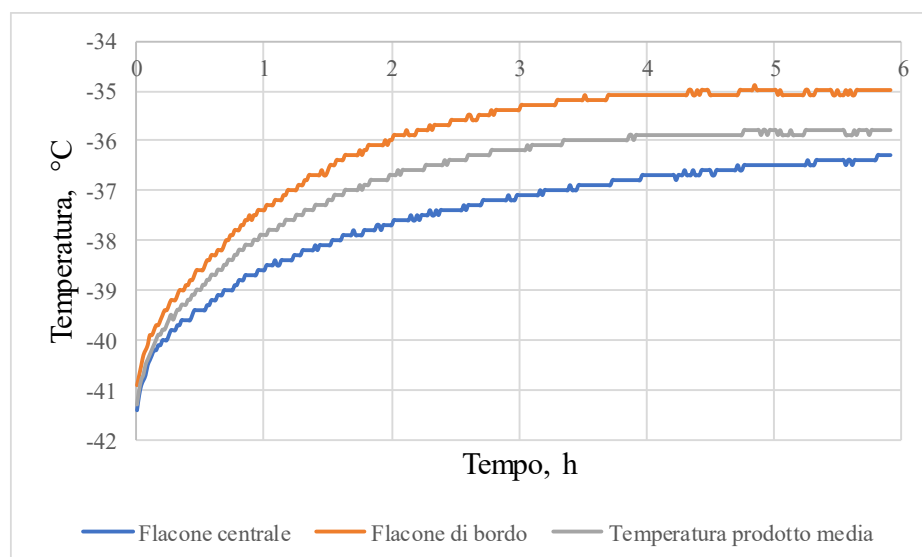
causa dell'abbassamento crioscopico, dipendente dalla molalità del soluto. Pertanto le condizioni ottimali di processo variano in base alla soluzione da liofilizzare, sia per la tipologia di soluto che per la sua concentrazione.

Inoltre, bisogna prestare molta attenzione nella scelta della pressione e della temperatura da adoperare durante l'essiccamento primario in quanto si deve evitare la denaturazione del principio attivo e il collasso della torta essiccata. Anche la durata dell'essiccamento primario è un fattore determinante: l'innalzamento di temperatura durante l'essiccamento secondario potrebbe portare al collasso della torta se anticipato troppo, quando sono presenti ancora cristalli di ghiaccio all'interno della soluzione, o si potrebbe aumentare troppo la durata dell'essiccamento primario se l'innalzamento di temperatura è ritardato (Fissore, 2013).

Durante la fase dell'essiccamento primario avviene un altro fenomeno che causa disomogeneità all'interno del *batch*, che va ad influenzare la temperatura dei flaconi più esterni. Il fenomeno in questione è l'effetto di bordo (*edge vial effect*).

L'effetto di bordo è dovuto al fatto che durante l'essiccamento primario il trasferimento di calore totale verso l'interfaccia di sublimazione è principalmente dipendente dai parametri operativi (temperatura del ripiano, pressione in camera) ma anche dalla geometria del flacone e, soprattutto, dalla posizione del flacone sul ripiano. (Pikal *et al.*, 1984; Rambhatla, Pikal, 2003; Pikal *et al.*, 2016; Scutellà *et al.*, 2017a). I flaconi di bordo ricevono un flusso di calore addizionale e presentano una temperatura del prodotto fino a 4-5°C più alta rispetto a quelli posizionati al centro (flaconi centrali). Questo può portare al collasso del prodotto se la temperatura supera un valore critico, come la temperatura di transizione vetrosa per un solido amorfo (come il saccarosio), o la temperatura di eutettico per un solido cristallino (come il mannitolo) (Fissore, 2013).

In Figura 1.7 è mostrato l'andamento della temperatura di due termocoppie che monitorano la temperatura di due flaconi in posizioni differenti durante l'essiccamento primario: una termocoppia posizionata al centro del *batch*, e una termocoppia posizionata in un flacone di bordo.



**Figura 1.7** Andamento delle temperature di due prodotti durante l'essiccamento primario, uno posizionato al centro del *batch* e una posizionata al bordo. È altresì mostrata la temperatura media del prodotto, definita da tutte le termocoppie utilizzate nel processo.

Pertanto, la posizione del singolo flacone sul ripiano influisce enormemente sulla qualità finale del prodotto.

L'effetto di bordo è uno dei problemi principali del controllo del processo di liofilizzazione, in quanto genera variabilità in termini di flusso di calore e temperatura del prodotto nel *batch* (Scutellà *et al.*, 2017b).

In un liofilizzatore classico, il flusso di calore ricevuto da un flacone deriva principalmente dalle pareti del liofilizzatore, dall'eventuale *rail* (cornice), dal ripiano e dal gas che avvolge i flaconi, con vari meccanismi di trasferimento (come irraggiamento, conduzione per contatto e attraverso il gas). Nell'articolo di Scutellà *et al.* (2017b) è stata analizzata l'importanza relativa del flusso di calore ricevuto dai flaconi a seconda della loro posizione. I contributi al flusso di calore analizzati sono stati 4:

- Trasferimento di calore dal ripiano per irraggiamento, conduzione per contatto e attraverso il gas che si trova fra il flacone e il ripiano a causa della concavità del fondo del flacone;
- Trasferimento di calore per conduzione attraverso il vapore acqueo che circonda il flacone;
- Trasferimento di calore dovuto all'irraggiamento del *rail*;
- Trasferimento di calore per irraggiamento dal ripiano superiore e dalle pareti del liofilizzatore.

Mentre il flusso di calore ricevuto dal ripiano è identico in quantità per tutti i flaconi, indifferentemente dalla loro posizione, la sua importanza varia se si considerano flaconi di bordo o flaconi centrali. Quelli di bordo ricevono un maggior flusso di calore a causa della conduzione attraverso il gas che circonda il flacone rispetto a quello ricevuto dal ripiano. La conduzione attraverso il gas risulta pertanto essere il contributo più importante, e non tanto l'irraggiamento dalle pareti o dal *rail*; questo è un risultato che si oppone all'idea generale che l'effetto di bordo sia dovuto principalmente all'irraggiamento. Altri studi (Gan *et al.*, 2005; S. Rambhatla, M.J. Pikal, 2003) hanno infatti dimostrato che l'effetto di bordo non è eliminato dalla schermatura dell'irraggiamento.

L'innalzamento della temperatura, oltre a generare possibili collassi del prodotto nei flaconi, porta al non evitabile risultato di avere diverse perdite di peso nel tempo, a causa della sublimazione, durante l'essiccamento primario. Oltre a ciò, l'effetto di bordo genera anche differenti valori di  $K_v$  (coefficiente di trasferimento di calore fra i flaconi e il ripiano) a seconda della posizione dei flaconi, come quelli che in prossimità della parete della camera, quelli a contatto con questi ultimi, e quelli al centro.

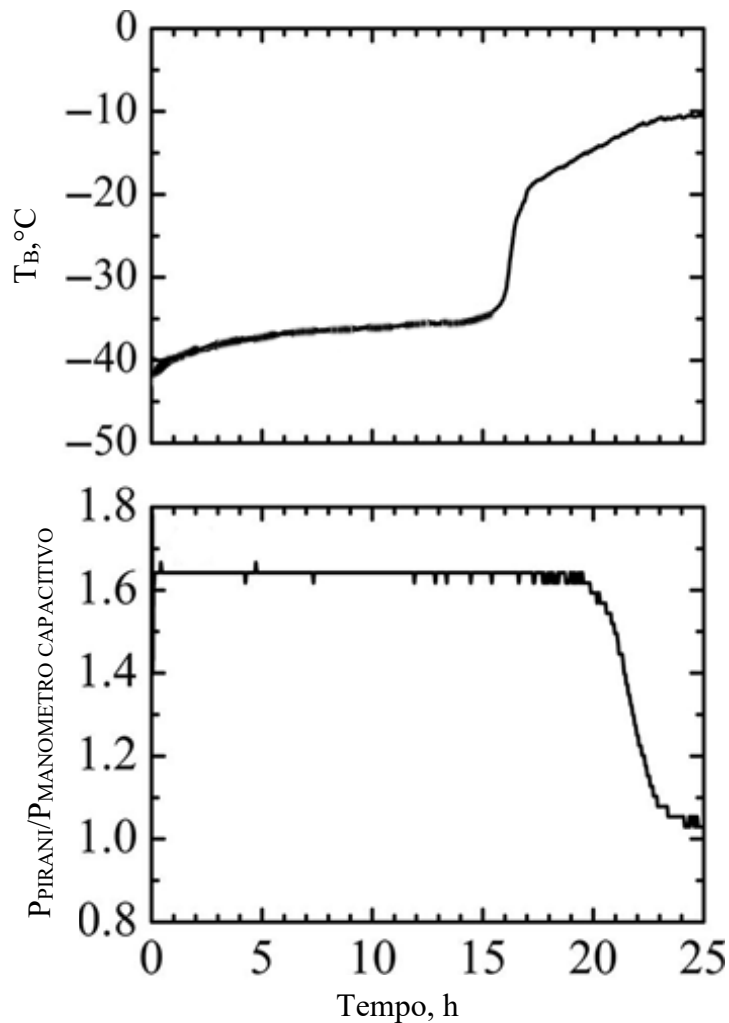
### *1.3 Determinazione della fine dell'essiccamento primario*

Risulta chiaro che l'essiccamento primario è la fase più delicata dell'intero processo in quanto determina la qualità del prodotto. Conoscere la sua durata, come descritto nelle sezioni precedenti, è fondamentale per non danneggiare il prodotto e per non aumentare la durata totale del processo. Se interrotto troppo presto, si potrebbe ottenere il collasso della torta formata a causa di un aumento eccessivo di temperatura durante l'essiccamento secondario. Se interrotto troppo tardi, il ciclo non sarebbe ottimizzato.

La determinazione della fine dell'essiccamento primario può essere effettuata con varie tecniche, suddivisibili principalmente in tre gruppi, a seconda se si monitorano singoli flaconi, un gruppo di flaconi o l'intero *batch*. Quelle interessanti per il seguente lavoro di Tesi sono basate sul monitoraggio del singolo flacone e dell'intero *batch*. Le descrizioni sono basate su (Fissore, 2013), in cui sono descritte altre tecniche utilizzabili, oltre quelle in seguito descritte.

Per il singolo flacone è possibile monitorarne la temperatura utilizzando una termocoppia o una termoresistenza, sebbene queste possono influenzare la dinamica del processo, essendo misure invasive, e possono velocizzare l'essiccamento primario rispetto agli altri flaconi. Inoltre, è difficile assicurare che siano posti esattamente al centro del fondo del flacone. Le termocoppie hanno dei risvolti negativi a partire dalla fase di congelamento, in quanto possono influenzare la nucleazione nel liquido metastabile, e quindi la dimensione dei cristalli, cosa che si traduce in un'alterazione della dinamica del flacone monitorato (Fissore *et al.*, 2018). In alcuni studi (Chen *et al.*, 2008; Bosca *et al.*, 2013) è stato anche dimostrato che le termocoppie segnalano un incremento di temperatura anomalo verso la fine dell'essiccamento primario, sebbene sia presente ancora del ghiaccio all'interno dei flaconi monitorati dalle termocoppie, il quale dovrebbe avvenire unicamente quando tutto il ghiaccio presente nel flacone è stato sublimato, cioè alla fine dell'essiccamento primario, in quanto il calore fornito ai flaconi non viene utilizzato più per la sublimazione del ghiaccio. Questo incremento di temperatura è probabile sia dovuto alla perdita di contatto fra la punta della termocoppia e il prodotto (Fissore *et al.*, 2018). L'utilizzo delle termocoppie è, inoltre, limitato al caso in cui non siano necessarie condizioni asettiche, e il posizionamento delle stesse all'interno del *batch* diventa una variabile da considerare, per via della disomogeneità di temperatura che si presenta.

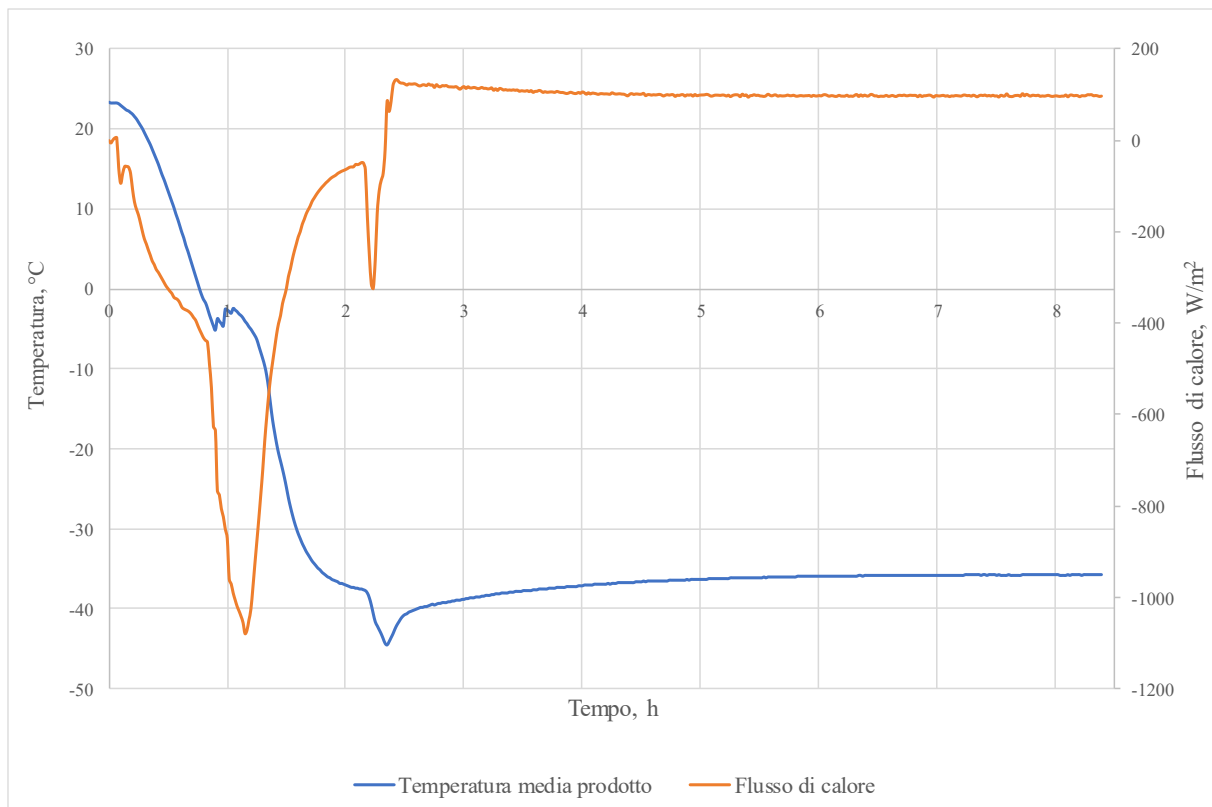
Per monitorare l'intero *batch* è possibile utilizzare un manometro capacitivo e uno a conduzione termica, il manometro Pirani. Il metodo si basa sul rapporto che si instaura fra la misura delle due diverse pressioni date dai due manometri. Il manometro Pirani è un manometro a conducibilità termica, che consiste in un filamento di metallo (solitamente Platino) sospeso in un tubo connesso al sistema di cui si desidera misurarne la pressione. Tale filamento è connesso ad un circuito elettrico che, dopo essere stato calibrato, permette di misurare la pressione. Infatti, è noto che un filo conduttore si riscalda quando la corrente passa attraverso esso. A causa dell'immersione in un gas, questo filamento perderà calore proporzionalmente alla quantità di gas presente, cioè alla pressione nella camera. Inoltre, la stessa resistenza del filamento varia con la temperatura, e per mantenerla costante si fa variare la corrente che passa al suo interno. Il ponte di Wheatstone a cui è collegato il filamento, tramite la misura della corrente necessaria per mantenere costante la temperatura del filamento, permette quindi di valutare la pressione. La conducibilità termica deve essere calibrata, e, nel caso d'interesse, è calibrata in aria, pertanto si parla di misura di pressione relativa. Il manometro capacitivo, invece, misura la pressione assoluta. Esso è un sensore a diaframma in metallo che può deflettersi in seguito a variazioni di pressione. Una faccia della membrana è esposta al gas e l'altra contiene un elettrodo assemblato in una camera di riferimento ad alto vuoto. La deflessione, anche se minima, è misurata osservando la variazione di capacità tra la membrana (sottoposta ad una pressione differenziale) e l'elettrodo. Questa variazione genera un segnale elettrico che converte la posizione della membrana in un segnale. Da ciò si trova la pressione. Pertanto, il rapporto fra i due valori di pressione dati dai due manometri permette di definire la fine dell'essiccamento primario, in quanto, in tale momento, non ci sarà più vapore acqueo e le due pressioni riporteranno lo stesso valore, dando un rapporto pari a uno. A titolo d'esempio, si mostra in Figura 1.8 l'andamento della temperatura del prodotto e del rapporto di pressioni, dove è possibile notare come la fine dell'essiccamento primario sia rilevata prima dalle termocoppie rispetto al rapporto delle pressioni.



**Figura 1.8** Andamento della temperatura del prodotto e del rapporto di pressione Pirani/manometro capacitivo durante l'essiccamento primario. Immagine tratta da Fissore *et al.* (2018), riproposta con modifiche.

### 1.3.1 Sensori di flusso di calore

Per la determinazione della fine dell'essiccamento primario, ma anche per un monitoraggio del processo di liofilizzazione, è possibile utilizzare i sensori di flusso di calore. Possono monitorare singoli flaconi, un gruppo di flaconi o l'intero *batch*. Essi riescono a monitorare il ciclo di liofilizzazione a partire dalla fase di congelamento in quanto rilevano i fenomeni di nucleazione, e sono anche in grado di determinare la fine dell'essiccamento primario (Fissore *et al.*, 2018). Permettono un controllo non invasivo non intaccando, pertanto, la dinamica dei flaconi, sebbene bisogna fare comunque attenzione al posizionamento del sensore. In Figura 1.9 è mostrato l'andamento del flusso di calore durante il congelamento, da cui si può notare il picco in corrispondenza della nucleazione, e durante l'essiccamento primario, in cui si mantiene costante.



**Figura 1.9** Andamento della temperatura media del prodotto e del flusso di calore durante le fasi di congelamento e di essiccamento primario.

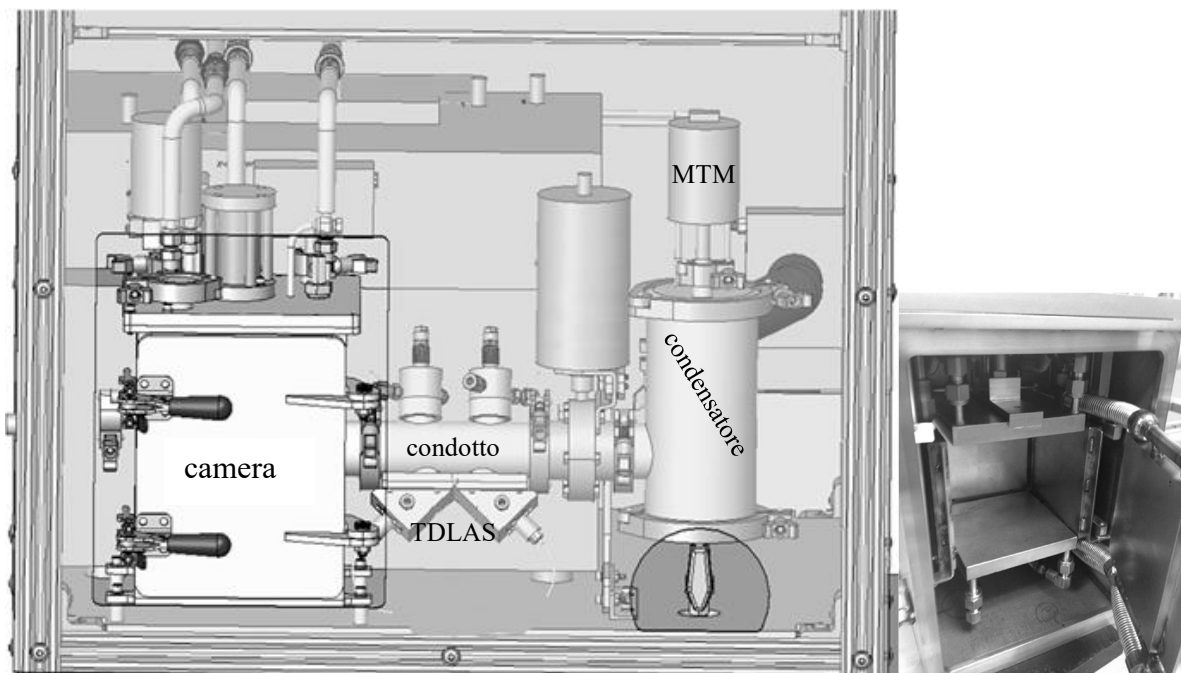
#### 1.4 Il MicroFD® e i micro-liofilizzatori

La liofilizzazione è un processo che necessita uno studio approfondito per ogni tipologia di prodotto che bisogna andare a trattare. Uno dei problemi principali nello sviluppo dei processi che coinvolgono i farmaci è la limitata quantità di principio attivo farmaceutico, anche da un punto di vista economico, utilizzabile durante la progettazione del processo di liofilizzazione, la quale potrebbe risultare eccessivamente onerosa. Da ciò nasce la necessità di impiegare micro-liofilizzatori. Questi nuovi tipi di liofilizzatori hanno vantaggi enormi rispetto ai classici liofilizzatori per quanto riguarda il *process design*, dal momento che le loro dimensioni permettono di eseguire dei cicli di liofilizzazione con una quantità di flaconi, e quindi di prodotto, contenuta, per poi eseguire uno *scale-up* soddisfacente. Due sono i micro-liofilizzatori principali presentati in letteratura: il mini-FD e il *MicroFD*® della Millrock Technology.

##### 1.4.1 Mini-FD

In Figura 1.10 si mostra una rappresentazione schematica del Mini-FD e una foto dell'interno della camera.





**Figura 1.10** Rappresentazione schematica del Mini-FD (versione *alpha*) a sinistra, e foto dell'interno della camera a destra. Immagine tratta da Obeidat et al. (2017), riproposta con modifiche.

Sebbene il risparmio di prodotto potrebbe essere risolto con l'utilizzo di pochi flaconi in un classico liofilizzatore, questo non darebbe una corretta descrizione dei fenomeni termici che avvengono al suo interno, principalmente a causa dell'effetto di bordo che interessa i flaconi esterni. Con pochi flaconi, la maggior parte saranno flaconi esterni, che hanno coefficienti di trasferimento di calore maggiori (Pikal *et al.*, 1984; Patel *et al.*, 2010; Pikal *et al.*, 2016): ciò porta ad avere temperature del prodotto più alte e tempi di essiccamento primario più corti. Il Mini-FD risolve questo problema tramite la possibilità di controllare la temperatura delle pareti della camera. Tramite tale controllo della temperatura il Mini-FD permette di simulare l'andamento della temperatura del prodotto di un qualsiasi altro liofilizzatore, di produzione o di laboratorio (Obeidat *et al.*, 2017), facilitando così lo *scale-up*, utilizzando solo pochi flaconi (per esempio sette flaconi da 20 cm<sup>3</sup>). Aggiustando la temperatura è possibile far comportare i flaconi esterni del Mini-FD come quelli esterni, o come quelli centrali, di un liofilizzatore di grandi dimensioni. Oltre ai problemi di simulare i coefficienti di scambio termico medi del *batch*, lo *scale-up* ha altri problemi, come la sola differenza di grandezza fra le due camere (quella del Mini-FD e quella di un classico liofilizzatore): i tempi necessari per caricare i flaconi, l'umidità dell'ambiente, il trasferimento di materia dell'essiccatore o differenze legate ai condensatori. La problematica più importante è, però, la temperatura a cui avviene la nucleazione in un Mini-FD e in un altro liofilizzatore, e ciò che questa comporta nella resistenza del prodotto durante la sublimazione dell'acqua. La resistenza del prodotto può essere studiata tramite le metodologie implementate all'interno del Mini-FD, quali l'MTM (*manometric temperature measurement*, misuratore della temperatura manometrica) o il TDLAS (*tunable diode laser absorption spectroscopy*, spettroscopia ad assorbimento laser) (Obeidat *et al.*, 2017).

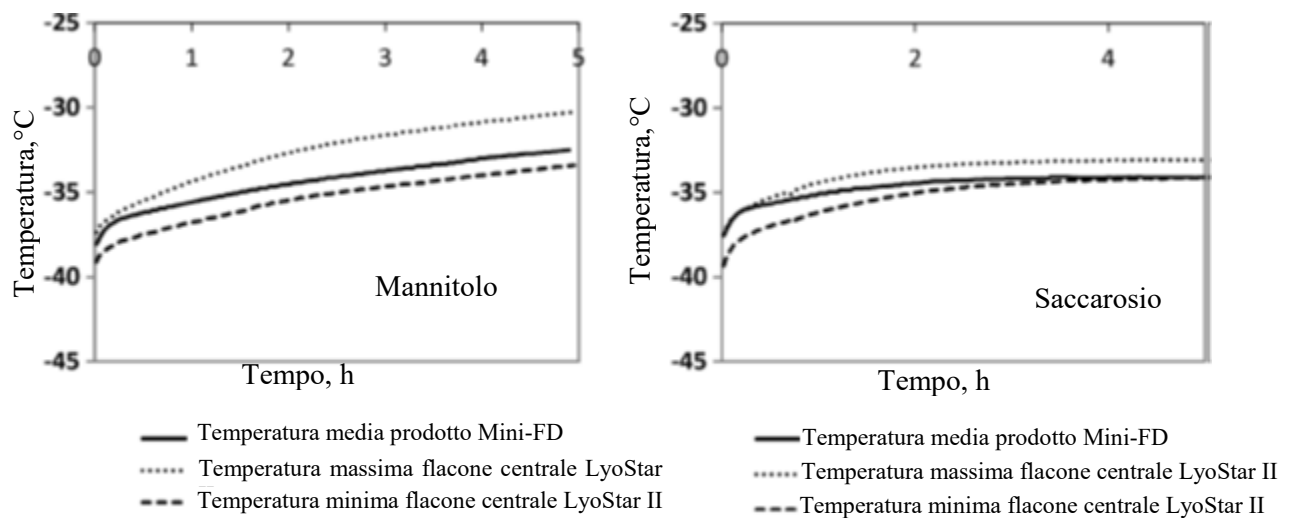
Nell'articolo di Obeidat et al. (2017) è stato dimostrato come il Mini-FD riesca a simulare il comportamento del prodotto in un liofilizzatore più grande, il LyoStar II. Lo studio si è basato su due tipologie di prove differenti per la temperatura delle pareti impostate nel mini-FD. Il primo set di prove ha utilizzato una temperatura delle pareti che simulava la temperatura dei flaconi esterni nel LyoStar II. Il secondo set di prove ha utilizzato, invece, una temperatura delle

pareti che simulava la temperatura dei flaconi interni nel LyoStar II. I risultati per il primo set di prove hanno dimostrato come i valori di  $K_v$  calcolati per via gravimetrica dei flaconi esterni avevano risultati molto simili fra quelli del Mini-FD e quelli del LyoStar II. I flaconi centrali esibiscono un valore leggermente diverso fra i due liofilizzatori, sebbene nel Mini-FD di flaconi centrali ne è presente solo uno, quindi la differenza può essere attribuita principalmente ad errori sperimentali. I risultati per il secondo set di prove, quando le pareti del Mini-FD sono state controllate affinché avessero una temperatura tale da simulare il comportamento dei flaconi centrali del LyoStar II, hanno invece evidenziato come valori di  $K_v$  dei flaconi centrali del LyoStar II erano molto simili ai valori di  $K_v$  propri di tutte i flaconi del Mini-FD.

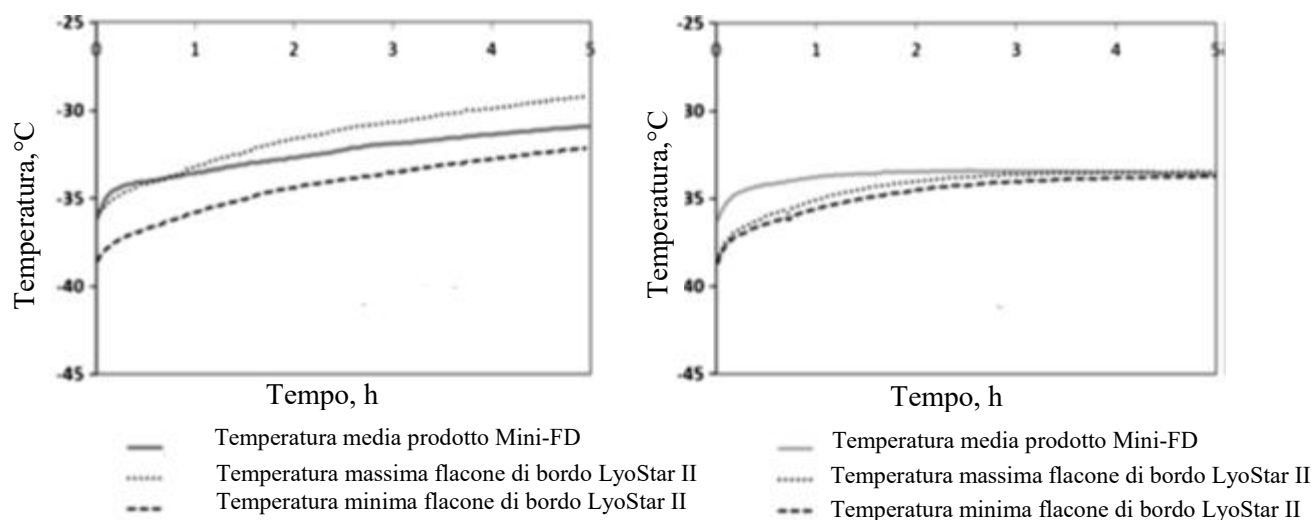
Nello studio è stato anche effettuato un paragone sulle temperature assunte dal prodotto durante la fase di essiccamento primario.

Lo studio è stato effettuato utilizzando due differenti tipologie di Mini-FD, differenti solo per la tipologia di parete a temperatura controllabile implementata: la versione *alpha*, caratterizzata da quattro pareti, e la versione *beta*, dove le quattro pareti sono sostituite da una parete unica cilindrica.

In Figura 1.11 e in Figura 1.12 è mostrato come l'andamento della temperatura media dei flaconi all'interno del Mini-FD, indipendentemente dalla temperatura impostata alle pareti, sia sempre nell'intervallo di temperatura determinato dalla temperatura massima e minima (dei flaconi di bordo o centrali) del LyoStar, tendendo ad assumere valori più vicini alla minima.



**Figura 1.11** Confronto della temperatura del prodotto durante la fase di essiccamento primario, con la temperatura delle pareti del Mini-FD impostate affinché i flaconi esterni del Mini-FD emulassero i flaconi centrali del LyoStar II. Figura tratta da Obeidat (2017), riportata con modifiche.



**Figura 1.12** Confronto della temperatura del prodotto durante la fase di essiccamento primario, con la temperatura delle pareti del Mini-FD impostate affinché i flaconi esterni del Mini-FD emulassero i flaconi di bordo del LyoStar II. Figura tratta da Obeidat (2017), riportata con modifiche.

Questi risultati sono prova del fatto che il Mini-FD può essere utilizzato per simulare il comportamento dei prodotti all'interno di liofilizzatori più grandi (Obeidat *et al.*, 2017).

#### 1.4.2 Micro-FD

Il Micro-FD è il micro-liofilizzatore utilizzato in questo lavoro di Tesi, in cui si è testata la sua efficacia. Si rimanda al capitolo 2 per un approfondimento sul micro-liofilizzatore e sulle sue particolarità.

### 1.5 Analisi PLS

I risultati ottenuti durante questo lavoro di Tesi sono stati analizzati tramite l'analisi della regressione parziale dei minimi quadrati (*Partial Least Square Regression*, PLS), un metodo molto utilizzato per la modellazione di processi industriali.

Questa tecnica permette di ridurre il numero elevato di variabili caratterizzanti il processo in esame, in poche nuove variabili, dette variabili latenti, fra loro indipendenti, ottenute da una combinazione lineare delle variabili di partenza. Queste nuove variabili riescono, comunque, a spiegare bene i dati originali di partenza, eliminandone le possibili ripetitività, andando a definire un nuovo sistema di riferimento di n-dimensioni. Il modello permette di analizzare una grande quantità di dati, evidenziando i valori che danno "rumore", ed è possibile utilizzarlo anche con dati mancanti (Dunn, 2018, Lindgren, 1993).

Per l'implementazione del metodo si parte dalla costruzione di due matrici di dati,  $\mathbf{X}$ , che contiene le variabili  $x$  sempre disponibili quando viene utilizzato il modello (fattori), e  $\mathbf{Y}$ , che contiene le variabili  $y$  non sempre disponibili (risposte). Partendo da  $N$  osservazioni, avremo, per ogni osservazione,  $K$  variabili  $x_k$  e  $M$  variabili  $y_m$ , da cui si costruiscono le due matrici  $\mathbf{X}$ , di dimensioni  $N \times K$ , e  $\mathbf{Y}$  di dimensioni  $N \times M$ . Il primo step da eseguire ottenute le due matrici è quello di trasformare, scalare e centrare nello zero, i dati. I dati verranno scalati ottenendo ogni variabile con varianza unitaria dividendola per la propria deviazione standard e poi centrati sottraendone il valore medio. Le variabili di tipo categorico utilizzate in questo lavoro sono descritte tramite combinazione di 1 e 0, dove il valore 1 viene utilizzato quando l'osservazione è caratterizzata dalla presenza della variabile categorica in esame, 0 quando non lo è.

La prima componente principale estrapolata dal modello è una retta,  $w_1$  nello spazio della  $\mathbf{X}$  e  $c_1$  nello spazio della  $\mathbf{Y}$ , la cui direzione permette di approssimare al meglio i dati iniziali e la relazione fra  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ . Ogni dato iniziale  $i$  viene proiettato sulla corrispondente retta, e tale proiezione sarà  $t_{i1}$  (per il dato  $x_i$  proiettato su  $w_1$ ) o  $u_{i1}$  (per il dato  $y_i$  proiettato su  $c_1$ ). Ogni componente principale successiva sarà sempre una retta perpendicolare alle precedenti nello spazio  $\mathbf{X}$  (non necessariamente anche nello spazio  $\mathbf{Y}$ ) (Dunn, 2018).

Al termine della ricerca delle componenti principali si ottiene un iperspazio di  $A$  dimensioni dove  $A$  è il numero delle componenti principali trovate. I vari  $t_{iA}$  e  $u_{iA}$ , ricavati come le proiezioni dei dati sull'iperspazio generato dalle componenti principali considerate, sono definiti rispettivamente come gli *scores* di  $\mathbf{X}$  e di  $\mathbf{Y}$  e andranno a definire due matrici:  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$ , di cui ogni singola riga costituisce le coordinate di un dato lungo tutte le componenti principali estrapolate, mentre le colonne costituiranno le coordinate di tutti i dati lungo una singola componente principale. Dalla matrice  $\mathbf{T}$  è possibile, inoltre, estrapolarne la varianza delle singole colonne, che costituiranno gli autovalori del modello.

Le relazioni, presenti in seguito, fra le varie matrici sono tratte da Wold et al. (2001). La matrice  $\mathbf{X}$  e la matrice  $\mathbf{T}$  sono legate dall'equazione (1.1)

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{W}^* \quad (1.1)$$

dove  $\mathbf{W}^*$  è la matrice delle correlazioni  $w^*$  fra  $\mathbf{X}$  e  $u(\mathbf{Y})$ , anche definiti pesi di  $\mathbf{X}$ . Le variabili  $x$  con maggior correlazione con  $\mathbf{Y}$  avranno pesi  $w$  maggiori. La differenza fra  $w$  e  $w^*$  sta nel fatto che la prima esprime solo nella prima dimensione la correlazione con le variabili  $x$  e gli *scores* di  $\mathbf{Y}$ , e nelle successive dimensioni esprime i residui di queste variabili  $x$  con i residui di  $\mathbf{Y}$ , mentre i valori di  $w^*$  esprimono la correlazione fra le variabili  $x$  e le risposte  $y$  in tutte le dimensioni. Nella prima dimensione, infatti,  $w=w^*$ , mentre nelle dimensioni successive i valori di  $w^*$  sono i pesi che combinano le variabili  $x$  per formare gli *scores*  $t$ . In generale le matrici  $\mathbf{W}$  e  $\mathbf{W}^*$  sono legate dall'equazione (1.2) proposta di seguito

$$\mathbf{W}^* = \mathbf{W}(\mathbf{P}'\mathbf{W})^{-1} \quad (1.2)$$

dove  $\mathbf{P}$  è la matrice delle direzioni (*loadings*) delle varie componenti nello spazio delle  $\mathbf{X}$ .

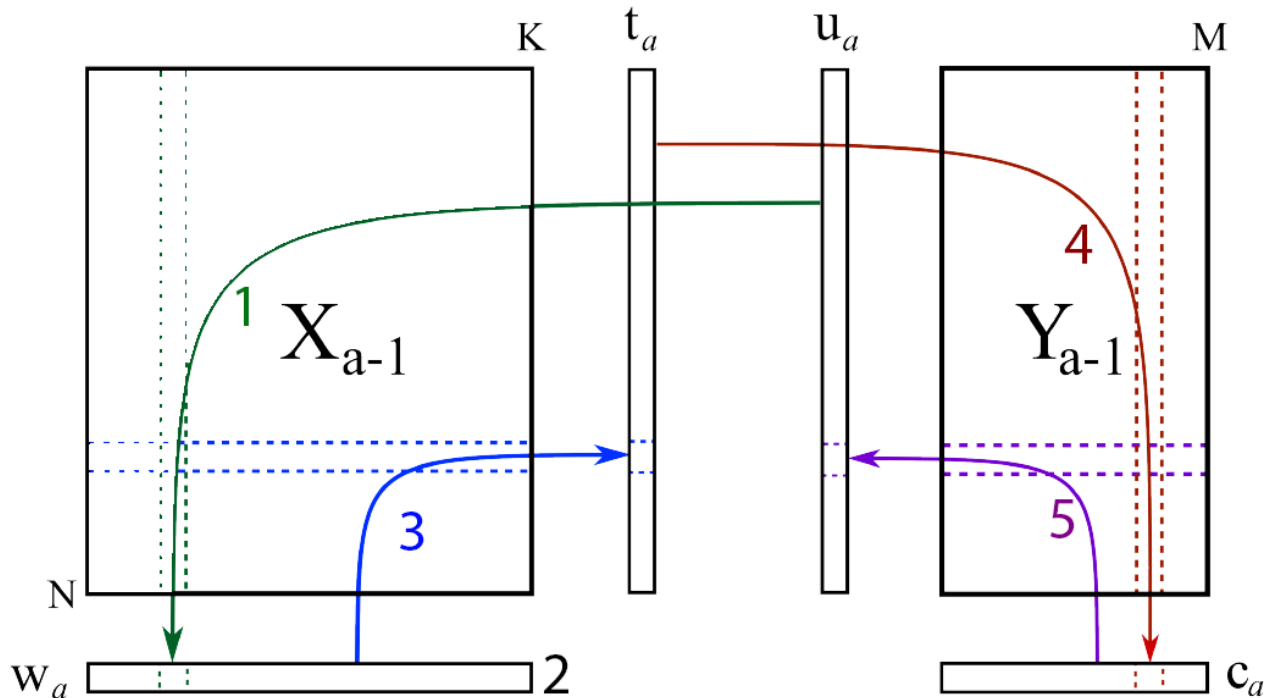
La matrice  $\mathbf{Y}$  e la matrice  $\mathbf{U}$  sono legate dall'equazione (1.3).

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{C}' + \mathbf{F} \quad (1.3)$$

dove  $\mathbf{C}$  è la matrice delle correlazioni  $c$  fra  $\mathbf{Y}$  e  $t(\mathbf{X})$ , anche definiti pesi di  $\mathbf{Y}$ , e la matrice  $\mathbf{F}$ , corrispondente al residuo, viene trovata tramite l'equazione (1.4) :

$$\mathbf{F} = \mathbf{Y} - \mathbf{T}\mathbf{C}' \quad (1.4)$$

In questo lavoro il modello PLS è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NIPALS, sviluppato da Wold et al. (1984), e presentato in Figura 1.13.



**Figura 1.13** Algoritmo NIPALS espresso per via grafica. Immagine tratta da Dunn (2018) e riproposta con modifiche.

Le due matrici devono essere scalate e centrate. Si parte da una colonna qualsiasi della matrice  $\mathbf{Y}$  la quale sarà la stima iniziale di  $\mathbf{u}$ . Si esegue la regressione della matrice  $\mathbf{X}_a$  sul vettore  $\mathbf{u}_a$  con l'equazione (1.5).

$$\mathbf{w}_a = \frac{1}{\mathbf{u}'_a \mathbf{u}_a} \cdot \mathbf{X}'_a \mathbf{u}_a \quad (1.5)$$

Dopo aver normalizzato il vettore di pesi  $\mathbf{w}_a$ , si esegue la regressione, tramite l'equazione (1.6) di ogni riga di  $\mathbf{X}_a$  sul vettore  $\mathbf{t}_a$

$$\mathbf{t}_a = \frac{1}{\mathbf{w}'_a \mathbf{w}_a} \cdot \mathbf{X}_a \mathbf{w}_a \quad (1.6)$$

Sul vettore  $\mathbf{t}_a$  si esegue la regressione delle colonne di  $\mathbf{Y}_a$  tramite l'equazione (1.7)

$$\mathbf{c}_a = \frac{1}{\mathbf{t}'_a \mathbf{t}_a} \cdot \mathbf{Y}'_a \mathbf{t}_a \quad (1.7)$$

Infine, si esegue la regressione tramite l'equazione (1.8) di ogni riga di  $\mathbf{Y}_a$  sul vettore dei suoi pesi  $\mathbf{c}_a$

$$\mathbf{u}_a = \frac{1}{\mathbf{c}'_a \mathbf{c}_a} \cdot \mathbf{Y}_a \mathbf{c}_a \quad (1.8)$$

Si esegue l'iterazione dall'equazione (1.5) all'equazione (1.8) fino a quando  $\mathbf{u}_a$  non varia più notevolmente. I quattro vettori,  $\mathbf{w}_a$ ,  $\mathbf{t}_a$ ,  $\mathbf{c}_a$  e  $\mathbf{u}_a$  trovati sono caratteristici della  $a$ -esima componente principale.

Successivamente, si rimuovono le variabilità già espresse da  $\mathbf{X}_a$  e  $\mathbf{Y}_a$ , andando a formare le nuove matrici  $\mathbf{X}_{a+1}$  e  $\mathbf{Y}_{a+1}$ , tramite le equazioni (1.9), (1.10) e (1.11):

$$\mathbf{p}_a = \frac{1}{\mathbf{t}'_a \mathbf{t}_a} \cdot \mathbf{X}'_a \mathbf{t}_a \quad (1.9)$$

$$\mathbf{X}_{a+1} = \mathbf{X}_a - \mathbf{t}_a \mathbf{p}'_a \quad (1.10)$$

$$\mathbf{Y}_{a+1} = \mathbf{Y}_a - \mathbf{t}_a \mathbf{c}'_a \quad (1.11)$$

Il procedimento si ripete dall'inizio per tutte le componenti principali.

Innanzitutto, bisogna determinare il numero di componenti principali da adottare nel modello. Il modello trova il parametro  $Q^2$ , la cui espressione è mostrata nell'equazione (1.12), indice della capacità di predizione del modello:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_i \sum_m (y_{im} - \hat{y}_{im})^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N y_{ik}^2} \quad (1.12)$$

dove  $\hat{y}_{im}$  è il valore predetto dal modello PLS della osservazione  $i$  della risposta  $y_m$  senza la suddetta osservazione. Un buon modello avrà un valore di  $Q^2$  superiore a 0.5, uno eccellente avrà un valore di  $Q^2$  superiore a 0.9. L'aumento del numero di componenti principali porterà, solitamente, ad un aumento dei valori dei suddetti parametri migliorando il modello, ma se vengono usate troppe componenti principali si avrà un problema di *overfitting* e il valore di  $Q^2$  decrescerà (Dunn, 2018). Quindi è bene scegliere il massimo numero di componenti principali che non generano una diminuzione del valore di  $Q^2$ .

La validità del modello è stata valutata tramite i grafici di controllo di due indici statistici, il  $T^2$  di Hotelling, equazione (1.13), e lo *Square Prediction Error (SPE)*, equazione (1.14). Entrambi si calcolano per ogni osservazione  $i$ -esima e permettono di evidenziare eventuali *outlier* fra le osservazioni, cioè un'osservazione che risulta essere anomala rispetto le restanti.

Il  $T^2$  di Hotelling riassume tutti i valori degli *scores* ed è la distanza di Mahalanobis della proiezione dell'osservazione  $i$ -esima sull'iperspazio definito dalle  $A$  componenti principali dal centro del suddetto iperpiano:

$$T_i^2 = \sum_{a=1}^{a=A} \frac{t_{i,a}^2}{s_a^2} \quad (1.13)$$

dove  $s_a^2$  è la varianza di ogni componente principale  $a$ . Più il suo valore è basso più l'osservazione in esame si trova vicino al centro del modello:

$$SPE_i = \sqrt{\mathbf{e}'_{i,A} \mathbf{e}_{i,A}} \quad (1.14)$$

dove

La bontà di predizione del modello validato può anche essere valutato in termini di variabilità di  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , rispettivamente, esplicita dal modello PLS con  $A$  componenti tramite i parametri  $R_x^2$  e  $R_y^2$  (equazioni (1.15) e (1.16)). Questi però possono, in realtà, indurre in errore. Non sempre un alto valore dei due si traduce in un modello eccellente, in quanto il loro valore cresce sempre e comunque con l'aumentare delle componenti principali considerate, anche quando

l'informazione modellata è poco più che semplice rumore di misura. Le espressioni per calcolare i due parametri sono riportate di seguito:

$$R_x^2 = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N \hat{x}_{ik}^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^N x_{ik}^2} \quad (1.15)$$

$$R_y^2 = \frac{\sum_{m=1}^M \sum_{i=1}^N \hat{y}_{im}^2}{\sum_{m=1}^M \sum_{i=1}^N y_{im}^2} \quad (1.16)$$

La principale differenza tra  $R_x^2$ ,  $R_y^2$  e  $Q^2$  è che quest'ultimo presenterà un massimo assoluto quando la modellazione del rumore di misura, per definizione aleatorio, in ulteriori componenti principali farà peggiorare la capacità di predizione del modello.

I risultati forniti dal modello permettono di capire come le varie variabili  $x$  influenzano le variabili  $y$  attraverso l'analisi delle componenti principali (come queste sono determinate e cosa determinano). Per ogni variabile della matrice  $\mathbf{X}$  si ricava altresì il *VIP* (*Variable Importance in the Projection*, importanza della variabile nella proiezione) tramite l'equazione (1.17), il quale permette di misurare quanto la variabile sia importante nella definizione dello spazio di proiezione e per spiegare  $\mathbf{Y}$ , la cui espressione è la seguente (Akarachantachote *et al.*, 2013):

$$VIP_k = \sqrt{K \frac{\sum_{a=1}^A w_{ak}^2 \cdot R^2(y, t_a)}{\sum_{a=1}^A R^2(y, t_a)}} \quad (1.17)$$

dove  $K$  è il numero di variabili  $x$ ,  $A$  è il numero di componenti principali,  $w_{ak}$  è il peso della variabile  $k$  nella componente principale  $a$  e  $R^2(y, t_a)$  è la frazione della varianza in  $y$  spiegata dalla componente  $a$ . Solitamente si considerano più importanti le variabili il cui *VIP* è maggiore di 1, e si trascurano quelle il cui valore è inferiore di 0.8, perché poco importanti nel modello (Wold, 1993)

## 1.6 Scopo della Tesi

Ricapitolando, le fasi della liofilizzazione sono tre:

1. Congelamento (*Freezing*);
2. Essiccamento primario (*Primary Drying*)
3. Essiccamento secondario (*Secondary Drying*)

Il lavoro di questa Tesi si è soffermato sui primi due step, andando a valutare possibili soluzioni alla disomogeneità all'interno del *batch*, dovuta principalmente a:

1. Diversa dimensione dei cristalli formati durante la fase di congelamento, a causa delle diverse temperature a cui avviene la nucleazione nei singoli flaconi;
2. Flussi di calore aggiuntivi ricevuti dai flaconi di bordo durante l'essiccamento primario.

Tramite l'utilizzo dell'apparecchiatura *MicroFD*® della Millrock Technology l'obiettivo è stato ridurre il più possibile la disomogeneità che si andava ad ottenere al termine delle prove a causa della diversa perdita di peso che si riscontrava nei flaconi.

I risultati sono stati analizzati per valutare l'effetto che i diversi parametri operativi, quali temperatura del ripiano e pressione della camera durante la fase di essiccamento primario, tipologia dei flaconi utilizzati, disposizione delle termocoppie e utilizzo della nucleazione controllata durante la fase di congelamento. Un altro parametro variato per ogni categoria di prova è stata la temperatura dell'anello presente all'interno della camera di essiccamento del *MicroFD*®, di cui si approfondirà meglio in seguito il funzionamento.

Nel capitolo 2 sono mostrate le caratteristiche del *MicroFD*® e come le prove sono state condotte, evidenziando i materiali utilizzati e quali sono state le analisi effettuate.

Nel capitolo 3 sono riassunti i risultati ottenuti dalle prove sperimentali. In questo capitolo si analizza l'effetto delle variabili per via grafica e per via statistica, tramite l'utilizzo del PLS.



## 2 Modello teorico e prove sperimentali

### 2.1 Il liofilizzatore *MicroFD*®

L'apparecchiatura utilizzata durante questo lavoro di Tesi è il *MicroFD*® della Millrock Technology, un liofilizzatore innovativo caratterizzato da piccole dimensioni, facile utilizzo e presenza del *LyoSim*® e del *LyoPat*® (un insieme di tecnologie costituito da: *Accuflux*®, *Auto-Dry*™ e *FreezeBooster*®).

#### 2.1.1 *LyoSim*®

Il *LyoSim*® è un anello di forma esagonale composto da sei blocchi che si trova all'interno della camera di essiccamento della macchina, al cui interno circola il fluido "Slytherm", un fluido siliconico a bassa viscosità e alto coefficiente di scambio termico, il quale ha la caratteristica di poter essere utilizzato per 10 anni di servizio. L'anello può operare in un intervallo di temperatura che va dai -60 ai +60°C, con una velocità di raffreddamento pari a 1°C al minuto e di riscaldamento pari a 2°C al minuto. È mostrato in Figura 2.1.

Bisogna assicurare il contatto fra i flaconi e le pareti del *LyoSim*® durante le prove, per questo è necessario utilizzare flaconi la cui dimensione sia corretta per l'anello installato (è possibile utilizzare due tipi di anelli, uno per i flaconi 6R, uno per i flaconi 10R).

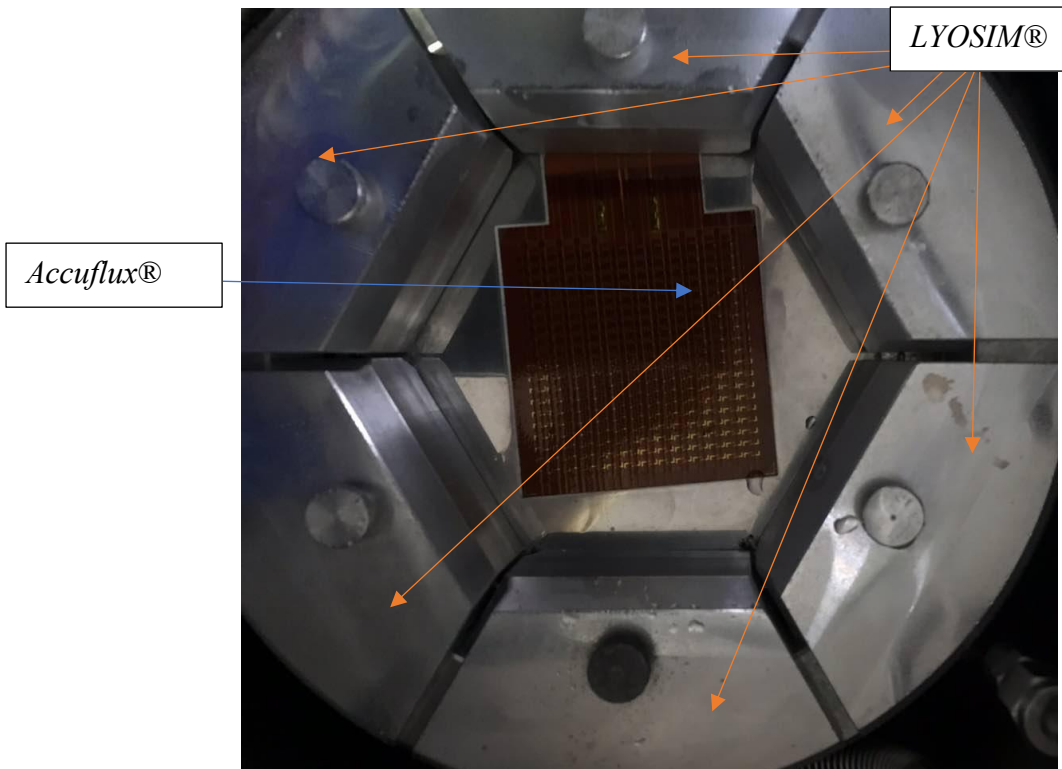
L'interfaccia utente del *MicroFD*® permette di impostare la temperatura del *LyoSim*® impostandola fra -15°C e +15°C rispetto la temperatura media del prodotto rilevata dalle termocoppie.

#### 2.1.2 *Accuflux*®

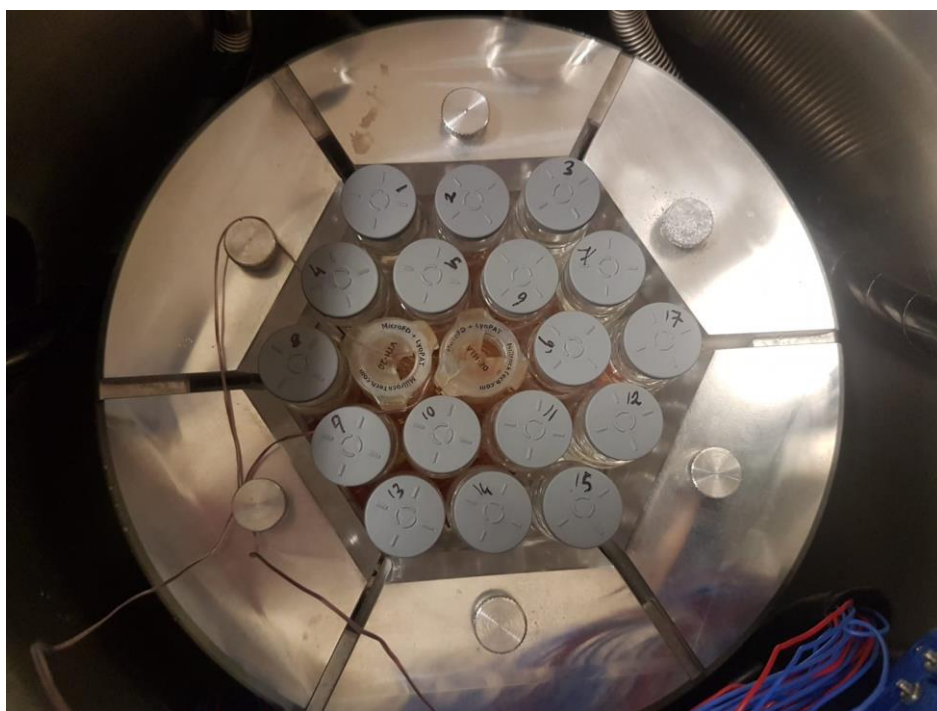
*Accuflux*® è un sensore di flusso termico posizionato sul ripiano della camera di essiccamento, come mostrato in Figura 2.1, in grado di rilevare anche la temperatura del ripiano. Si pone come aggiunta alle termocoppie per il monitoraggio del processo. La accuratezza di *Accuflux*® è stata studiata da Konrad *et al.*, (2016) confrontando i risultati che riportava *Accuflux*® rispetto a quelli ricavabili dalle temperature lette dalle termocoppie, dimostrando come questo era in grado di rilevare la fine dell'essiccamento primario in linea con quanto determinato dalle termocoppie. Le rilevazioni effettuate da *Accuflux*® comparate con le misure di pressione mostrano che il primo rileva la fine dell'essiccamento primario anticipatamente se non riesce a monitorare tutte i flaconi del *batch*. *Accuflux* non ricopre infatti l'intero ripiano, e questo potrebbe portare a rilevazioni non corrette del flusso di calore. Confrontando Figura 2.1 con Figura 2.2 risulta evidente che alcuni flaconi non sono a contatto col sensore. Sarebbe, quindi, opportuno porre il sensore anche in diversi punti del ripiano.

Si sottolinea che, tramite il flusso di calore letto durante il processo di essiccamento, il *MicroFD*® fornisce il coefficiente di scambio termico  $K_v$ , dato da:

$$K_{v,shelf} = \frac{\text{flussodicalore}}{T_S - T_B} \quad (2.1)$$



**Figura 2.1** *Accuflux*®, sensore che permette di rilevare il flusso di calore proveniente, o diretto, dal ripiano e *LyoSim*® all'interno della camera di essiccamento.



**Figura 2.2** Camera di essiccamento del *MicroFD*® con il numero massimo di flaconi 6R al suo interno (19).

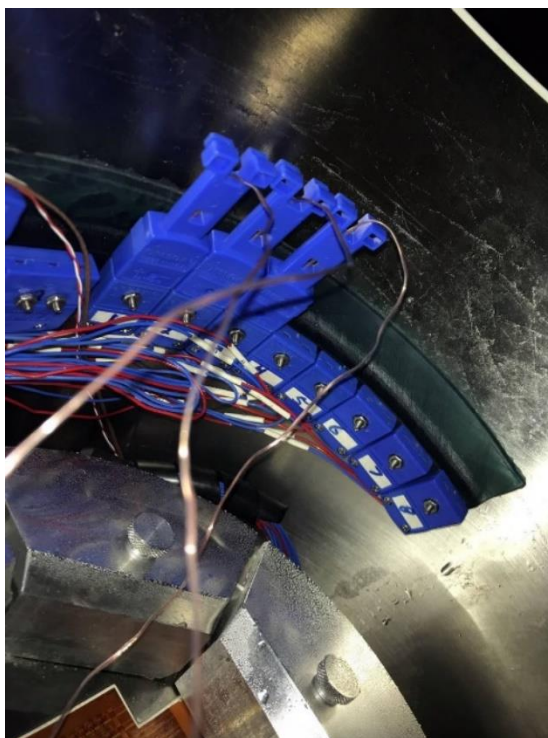
In Figura 2.3 è mostrata una foto del *MicroFD*® con le dimensioni caratteristiche.



**Figura 2.3** *MicroFD*®. Dimensioni di 51cm x 76 cm con un'altezza di 170 cm. Peso di circa 136 kg.

Sollevando il coperchio possiamo osservare la camera in cui vengono posizionati i flaconi, mostrata in Figura 2.1 e Figura 2.2. Il ripiano della camera, che ospita *Accuflux* e *LyoSim*®, ha una forma circolare di 6 pollici di diametro (15,24 cm) e al cui interno circola il fluido “Slytherm”. È presente anche una piastra di chiusura controllata elettro-meccanicamente, al cui interno scorre lo stesso fluido che scorre nel ripiano e la cui temperatura è controllata allo stesso modo di quella del ripiano. Nella camera si può raggiungere un vuoto pari a 10 mTorr (circa 1,33 Pa; 0,00001 atm). La pressione al suo interno è monitorata tramite un sensore Pirani e un manometro capacitivo, controllata con la tecnologia Millrock basata sul rapporto delle pressioni lette dai due sensori. La camera riesce a raggiungere 100 mTorr partendo da pressione atmosferica in circa 15 minuti.

Sempre all'interno della camera è possibile adoperare fino a 8 termocoppie collegate direttamente alla macchina. Esse sono mostrate in Figura 2.4.



**Figura 2.4** Termocoppie presenti nella camera di essiccazione e relativo alloggiamento nella camera. In questa foto sono inserite tre delle possibili 8 termocoppie.

Il condensatore è esterno alla camera ed è composto da una serpentina. Può raggiungere una temperatura inferiore ai  $-70^{\circ}\text{C}$ , con una velocità di condensazione di 0,5 litri al giorno. Esso è isolato dalla camera tramite una valvola pneumatica a farfalla, di 2 pollici di diametro (5,08 cm). Lo sbrinamento del condensatore avviene tramite gas riscaldato. La Figura 2.5 mostra una foto del condensatore.



**Figura 2.5** Condensatore esterno del *MicroFD*®.

In dotazione con il sistema vi è un computer portatile che funziona da pannello di controllo per l'essiccatore poiché comunica con il controllore logico programmabile (PLC) installato nella macchina.

Dopo aver collegato tutte le *utilities* necessarie all'essiccatore (acqua, aria compressa e elettricità), accendendo il computer la prima schermata che compare è quella mostrata in Figura 2.6.



Figura 2.6 Schermata iniziale del programma necessario al controllo del *MicroFD*®.

Dopo aver cliccato sullo schermo comparirà l'interfaccia *software* che permette di controllare l'apparecchiatura (Figura 2.7).

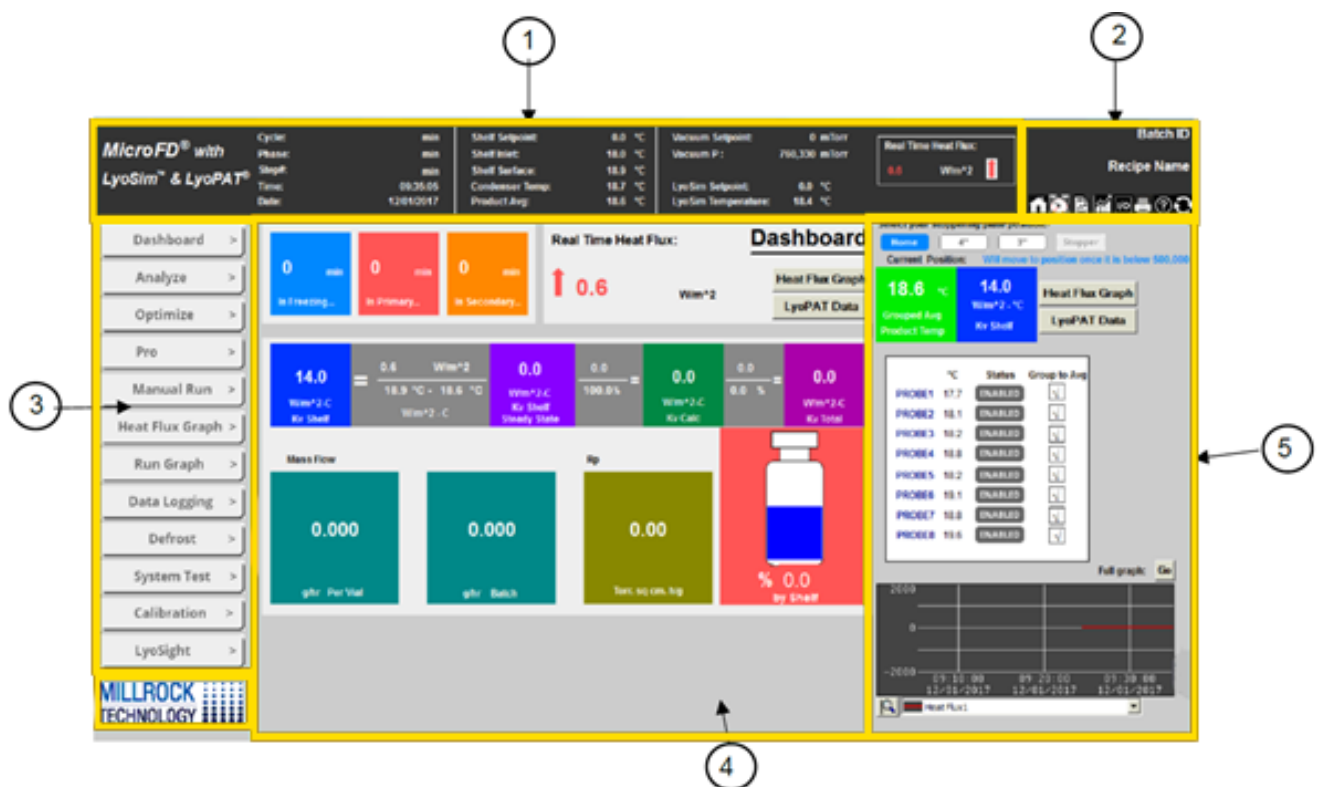


Figura 2.7 Interfaccia grafica del programma

Di seguito saranno verranno descritte le funzionalità utili alla riproducibilità del lavoro di Tesi, o particolarmente utili per studi futuri. Le funzioni non descritte non sono state utilizzate né prese in considerazione per studi futuri.

La schermata presenta in alto varie informazioni sul processo:

1. In testa sono mostrate informazioni sul processo, come durata e data dello stesso, temperature del ripiano e del condensatore, livello di vuoto, indicando quello letto dal sensore di Pirani (0 – 760000 mTorr) e quello letto dal manometro capacitivo (0 – 2000 mTorr, che verrà mostrato solo quando la pressione sarà compresa in questo intervallo); Temperatura del *LyoSim*® e flusso di calore in tempo reale;
2. Qui sono presenti i tasti di accesso rapido (*Home*, allarmi, etc.) e informazioni sulla ricetta, come il codice identificativo del *Batch* e il nome della ricetta del ciclo corrente;
3. In questa sezione sono presenti collegamenti che rimandano a varie interfacce:
  - a. *Dashboard*, permette di osservare velocemente i tempi delle varie fasi (congelamento, essiccamento primario, essiccamento secondario) e fornisce i parametri critici del processo ( $K_v$ ,  $R_p$ , flusso di massa e percentuale essiccata).
  - b. *Analyze*, permette di creare una ricetta da far eseguire al *MicroFD*®; Il *LyoSim*® è controllato impostando una temperatura compresa fra più o meno 15°C rispetto alla temperatura media del prodotto.
  - c. *Optimize*, in cui è possibile utilizzare le seguenti funzioni:
    - i. Nucleazione controllata;
    - ii. Congelamento tramite il controllo del flusso di calore *Accuflux*®;
    - iii. Essiccamento primario con l'*AutoDry*®.
    - iv. Il *LyoSim*® è controllabile allo stesso modo della modalità *Analyze*.
  - d. *Pro Mode*, che funziona come la modalità *Optimize*, dando però la possibilità all'utente di usare un  $K_{v,Shelf}$  predeterminato per predire la temperatura media del prodotto durante l'essiccamento primario e dando la possibilità di controllare il *LyoSim*® per step, oltre a come è possibile controllarlo nelle modalità *Optimize* e *Analyze*.
  - e. *Manual mode*, in cui è possibile gestire ogni singola parte della macchina in modo manuale. È possibile impostare la temperatura del ripiano, la temperatura del *LyoSim*®, impostare e controllare il livello di vuoto, gestire la valvola che isola condensatore e camera di essiccamento e effettuare una nucleazione controllata manualmente.
  - f. *Heat Flux Graph*, che permette all'utente di monitorare il flusso di calore, la temperatura del fluido del ripiano e della sua superficie e la temperatura media del prodotto. È possibile anche osservare il grafico dei parametri critici del ciclo (flusso di massa,  $R_p$ ,  $K_{v,Shelf}$  e la percentuale di prodotto essiccato).
  - g. *Defrost* (sbrinamento). Permette di sbrinare il condensatore impostando la durata del processo per un minimo di 1 minuto fino ad un massimo di 30 minuti. Durante questo periodo un gas caldo verrà fatto circolare all'interno del condensatore. La temperatura nel condensatore oscillerà fra i 40°C e i 60°C durante il processo. È necessario svolgere lo sbrinamento del condensatore in seguito alla terminazione di ogni ciclo di liofilizzazione.



4. In questa parte dello schermo sono mostrate le finestre scelte fra i vari collegamenti della sezione 3.
5. In questa sezione è possibile visualizzare:
  - a. La posizione della piastra di chiusura rispetto al ripiano (“*home*”, cioè posizione iniziale; 4 pollici o 3 pollici);
  - b. La temperatura media delle termocoppie (evidenziata in verde) o l’attuale valore del  $K_{v,Shelf}$  (evidenziato in blu). Tramite il tasto “*Heat Flux Graph*” è possibile visualizzare il grafico del flusso di calore (mostrato in basso).
  - c. La temperatura di ogni termocoppia espressa in gradi centigradi. La sezione “*status*” di ogni termocoppia può essere impostata su “*Enabled*” (abilitata) o “*Disabled*” (disabilitata). Se la termocoppia è abilitata verrà mostrata la temperatura da essa misurata. Ogni box sotto la scritta “*Group to Avg*” permette di scegliere quale termocoppia considerare nel calcolo della temperatura media del prodotto, utilizzata dal *software* per la determinazione della temperatura del *LyoSim*®.

In questo lavoro di Tesi sono state sfruttate unicamente la modalità “*Analyze*” e la modalità “*Optimize*” del *MicroFD*®. La prima per le prove condotte con nucleazione spontanea, la seconda per le prove condotte con nucleazione controllata.

### 2.1.3 Modalità *Analyze*

La schermata mostrata in Figura 2.8 è quella che viene mostrata dal programma cliccando sulla linguetta “*Analyze*”.



Figura 2.8 Interfaccia della modalità *Analyze*.

1. In questa sezione è possibile indicare il nome del prodotto e il numero, oltre a una breve descrizione. Tramite le icone è possibile creare una nuova ricetta, caricarne una esistente, salvare la ricetta o cancellarla. In verde è evidenziato il tasto “*Start Cycle*” che permette di avviare la ricetta, mentre le funzioni “*Auto Backfill*” e “*Auto Stopping*” permettono rispettivamente di alzare la pressione e chiudere i tappini al termine del ciclo definito dalla ricetta.
2. La finestra “*Loading*” permette di impostare la temperatura del ripiano e del *LyoSim*® in maniera manuale consentendo all’utente di caricare i flaconi nella camera. Una volta che si è pronti ad avviare la ricetta è sufficiente cliccare sul tasto “*Go*”. In questa sezione è possibile indicare le caratteristiche principali del *Batch*, come la frazione massica di soluto nella soluzione, il numero di flaconi inseriti, il diametro esterno (*OD*) e interno (*ID*) del singolo flacone, la temperatura critica del prodotto, la quantità di acqua per flacone, espressa in grammi, e la massa del flacone vuoto.
3. Questa è la sezione relativa alla fase di congelamento, dove è possibile impostare fino a 10 *step* da far eseguire al programma. È possibile modificare la temperatura del ripiano e la durata di ogni singolo *step*. Il “*LyoSim*® track offset” permette di selezionare quale termocoppia deve essere considerata per il controllo della temperatura del *LyoSim*®. Impostando “9” si considererà la temperatura media delle termocoppie. In “*Track Offset*” è possibile impostare un valore di temperatura nell’intervallo  $\pm 15^{\circ}\text{C}$  che la temperatura del *LyoSim*® deve assumere rispetto alla temperatura da seguire indicata nel “*LyoSim*® *Track Offset*”. Nella finestra “*Final Freeze*” si può indicare uno *step* aggiuntivo che verrà eseguito in seguito al termine dei 10 precedenti. Qui è possibile indicare, oltre alla temperatura del ripiano da raggiungere e alla durata dello stesso *step*, anche il grado di vuoto che si vuole raggiungere. Bisogna notare che se in uno *step* del congelamento è indicata una temperatura diversa da quella attuale del ripiano, la durata espressa in minuti indica il tempo che il ripiano deve impiegare per raggiungere la suddetta temperatura. Se si inserisce “0” la temperatura sarà raggiunta nel minor tempo possibile al *MicroFD*®. Se in uno *step* del congelamento è indicata una temperatura identica a quella attuale del ripiano, la durata espressa in minuti indica il tempo che il ripiano deve mantenersi a quella temperatura. Se si inserisce “0” lo *step* viene saltato.
4. Terminato il “*Final Freeze*” il programma passerà alla fase dell’essiccamento primario. In questa sezione è possibile impostare fino a 16 *step* da far eseguire al programma durante la fase di essiccamento primario. Il funzionamento è identico agli *step* del congelamento. È possibile in aggiunta indicare la pressione della camera. In basso a destra è possibile abilitare l’“*Auto Ending Of Primary Drying*”, *Auto EOPD*, che permette di concludere la fase di essiccamento primario in modo automatico. Questa funzione si basa sulla differenza di pressione fra il sensore Pirani e il manometro capacitivo. Se la differenza fra i due è uguale o inferiore al valore di pressione indicato, e se questa condizione viene mantenuta per più di 5 minuti, il programma avanzerà agli *step* 14, 15 e 16 dell’essiccamento primario automaticamente, indifferentemente dallo *step* in cui si trova quando il criterio è soddisfatto. Se gli *step* 14, 15 e 16 sono riempiti con 0, verranno automaticamente saltati e il processo passerà alla fase dell’essiccamento secondario. Sarebbe opportuno impostare all’ultimo *step* dell’essiccamento primario, diverso dal 14, 15 e 16, una durata di 9999 minuti (valore massimo inseribile, corrispondente a circa una settimana) per far sì che la funzione *Auto EOPD* venga utilizzata in modo corretto.
5. In questa sezione è possibile impostare la temperatura da far raggiungere al ripiano durante l’essiccamento secondario e la rampa di velocità con cui deve essere raggiunta.



Una volta raggiunta la temperatura indicata, il sistema si manterrà nelle condizioni indicate per il tempo indicato in “Time”. Anche in questa sezione è possibile impostare la temperatura del *LyoSim*®, rispetto alla temperatura letta da una termocoppia o alla media di tutte le termocoppie aggiunte alla media, e la pressione presente in camera.

È possibile inoltre impostare la temperatura del ripiano e del *LyoSim*® e la pressione da avere in camera nella fase di “Storage”, successiva alla fase di essiccamento secondario. Tali condizioni verranno mantenute fino a quando non si interromperà manualmente il ciclo.

La sezione “Alarms” permette di impostare dei valori limite da non superare durante la fase di essiccamento primario. Se il *software* rileva che la temperatura del condensatore supera il valore indicato in “Cond Overload”, o se la pressione supera il valore indicato in “Vacuum Overload”, o se la macchina rimane senza corrente per più dei minuti indicati in “Power Outage”, il processo tornerà allo step del “Final Freeze” ricongelando il prodotto e ricominciando da capo la fase di essiccamento primario.

#### 2.1.4 Modalità *Optimize*

La schermata *Optimize* è identica a quella della modalità *Analyze*, con l’aggiunta di tre possibili funzioni da utilizzare durante il ciclo, mostrate in Figura 2.9.

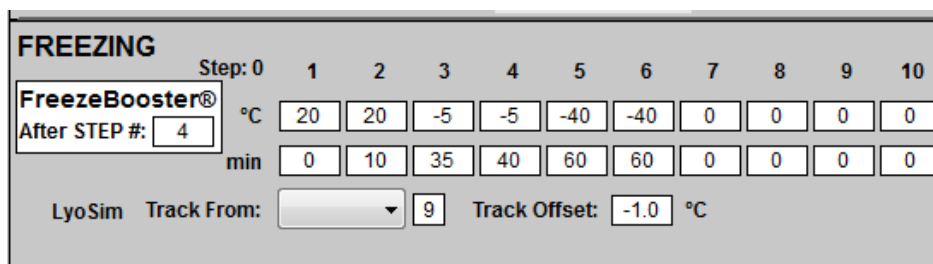


Figura 2.9 Opzioni utilizzabili nella modalità *Optimize*.

Le prime due opzioni operano solamente sulla modalità di congelamento, e non influiscono sull’essiccamento primario e secondario, i quali saranno gestibili come in modalità *Analyze*.

##### 1. *FreezeBooster*®

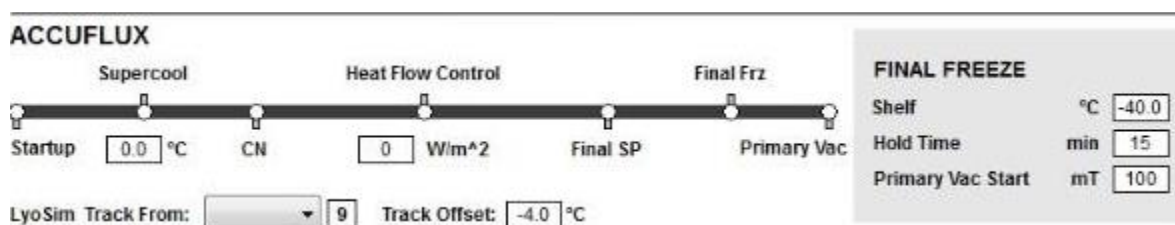
Questo comando, se impostato su “AUTO”, permette di eseguire una nucleazione controllata durante il processo di congelamento. La sua applicazione è molto semplice, è sufficiente impostare nel box “After STEP #” lo *step* che deve concludersi prima dell’avvio della nucleazione controllata. Terminato il processo di nucleazione controllata il programma passerà allo *step* successivo. In Figura 2.10 è mostrato un esempio di utilizzo del *FreezeBooster*®.



**Figura 2.10** Esempio di utilizzo del *FreezeBooster®*. In questo esempio la nucleazione controllata viene fatta avvenire successivamente al mantenimento della temperatura di -5°C per 40 minuti (passaggio 4 della schermata).

## 2. Freezing Method: Accuflux®

Selezionando *Accuflux®* in *Freezing Method* si presenterà la schermata mostrata in Figura 2.11. Con questa opzione selezionata la fase di congelamento avviene in modo completamente automatico ed è necessario indicare unicamente la temperatura di sotto-raffreddamento e il flusso di calore da avere dopo la nucleazione controllata. Questa modalità svolge automaticamente anche la nucleazione controllata ed essa opera sulla temperatura del ripiano affinché, durante il raffreddamento, venga raggiunta la temperatura di sotto-raffreddamento indicata. Non appena il flusso di calore si stabilirà attorno ai  $\pm 50 \frac{W}{m^2}$ , il programma eseguirà la nucleazione controllata. Terminata la nucleazione controllata il programma gestirà la temperatura del ripiano per mantenere il flusso di calore ai valori indicati dall'utente. È possibile, come con l'utilizzo del *FreezeBooster®*, regolare la temperatura del *LyoSim®* come descritto per la modalità *Analyze*.



**Figura 2.11** Schermata dell'*Accuflux®*.

## 3. Primary Drying Method: AutoDry®

L'utilizzo della modalità *AutoDry®* dà la possibilità, impostando pochi input (mostrati in Figura 2.12), di far avvenire la fase dell'essiccamento primario in modo automatico.



**Figura 2.12** Schermata dell'*AutoDry®*.

## 2.2 Prove sperimentali

Le prove effettuate sono state 33. Per ogni prova si è sempre utilizzata una soluzione di acqua con saccarosio al 5% in peso, che veniva accuratamente preparata e pipettata nei 19 flaconi 6R che venivano posti all'interno della camera di essiccazione dopo essere stati singolarmente pesati senza tappo.

Sono stati utilizzati due tipologie di flaconi:

1. *Molded*, o soffiati. Sono flaconi ottenuti utilizzando un processo di iniezione di vetro fuso all'interno di uno stampo, dove, tramite l'ausilio di aria compressa, si ottiene la forma corrispondente allo stampo. Questi flaconi sono caratterizzati da un peso maggiore rispetto a quelli tubolari e sono evidenti gli strati al suo interno. Sono caratterizzati, inoltre, da un fondo più spesso, il quale può aggiungere resistenza allo scambio di calore con il ripiano. In Figura 2.13 è mostrato uno dei flaconi *molded* utilizzati.



**Figura 2.13** Flacone *Molded*. Si nota la struttura irregolare delle pareti e del fondo, molto più spesso rispetto ai flaconi tubolari.

2. Tubolari, ottenuti partendo da un cilindro di vetro di un definito diametro esterno e spessore delle pareti. Hanno il fondo molto più sottile e regolare rispetto ai flaconi soffiati. In Figura 2.14 è mostrato un flacone tubolare.



**Figura 2.14** Flacone tubolare. In questa tipologia di flacone le pareti e il fondo sono nettamente più sottili e omogenee rispetto quelli *molded*.

Ciascun flacone, prima dell'inizio della singola prova, è stato numerato tramite il tappo (*stopper*) posto su di esso. La numerazione partiva da 1 fino al numero di flaconi usati, escludendo quelli in cui veniva inserita la termocoppia. Ciascuna termocoppia è stata inserita nei flaconi attraverso dei tappi in dotazione con il *MicroFD*®, i quali assicurano un corretto posizionamento della termocoppia, rendendo più facile il contatto con il centro del fondo del flacone. In Figura 2.15 e Figura 2.16 sono mostrate le foto del tappo in cui alloggia la termocoppia e del tappo utilizzato per i flaconi senza termocoppia.



**Figura 2.15** Tappo in cui viene inserita la termocoppia.



**Figura 2.16** Tappo per flaconi di cui non monitorare la temperatura.

### 2.2.1 Struttura delle prove

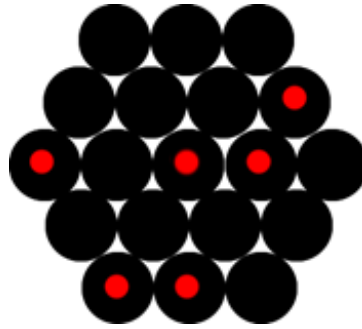
Le prove effettuate sono state organizzate affinché si trovassero le condizioni migliori per ottenere maggior omogeneità all'interno del *batch* alla fine dell'essiccamento primario. Tale omogeneità è stata valutata tramite la perdita di peso che ogni flacone presentava al termine del ciclo, e tramite la deviazione standard di tali misure. I parametri iniziali impostati sono stati di 60 mTorr per la pressione della camera e  $-20^{\circ}\text{C}$  per la temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario. La fase del congelamento era stata impostata per far raggiungere al ripiano la temperatura di  $-40^{\circ}\text{C}$  il più velocemente possibile a partire da temperatura ambiente, per poi mantenere  $-40^{\circ}\text{C}$  per un'ora. In queste condizioni la nucleazione del prodotto avveniva in modo spontaneo. L'idea di partenza è stata quella di osservare come poter migliorare l'omogeneità operando unicamente sui parametri dell'essiccamento primario quali temperatura del ripiano e pressione della camera.

Le condizioni indicate precedentemente sono state adottate come punto di partenza per le prove a seguire, poiché ciò che inizialmente è stato valutato è stato l'effetto della temperatura del *LyoSim*® sull'omogeneità del processo. Il *LyoSim*® è stato impostato affinché avesse, per tre prove differenti, una temperatura di  $-1^{\circ}\text{C}$  o di  $-3^{\circ}\text{C}$  o di  $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto alla temperatura media del prodotto letta dalle termocoppie, disposte in modo casuale all'interno del batch.

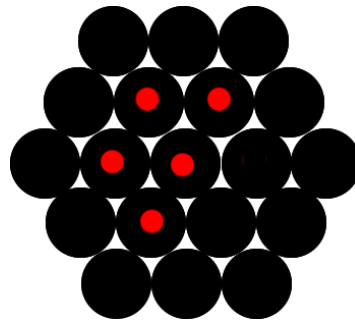
Per avere uno spettro più ampio di risultati, ogni prova a seguire, con temperatura del ripiano e pressione della camera definita, è stata eseguita variando la temperatura del *LyoSim*® con la stessa "tripletta" (salvo casi particolari):  $-1^{\circ}\text{C}$ ,  $-3^{\circ}\text{C}$  e  $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto alla temperatura media del prodotto.

Dopo aver valutato l'effetto che la temperatura del *LyoSim*® avesse sulle prove, è stata inizialmente variata la temperatura del ripiano a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Poiché questa temperatura ha generato dei risultati non drasticamente differenti rispetto quelli ottenuti con la temperatura del ripiano a  $-20^{\circ}\text{C}$  è stato deciso di innalzare la temperatura del ripiano a  $0^{\circ}\text{C}$  e la pressione della camera a 90 mTorr.

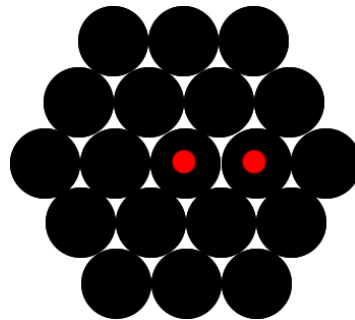
La disposizione delle termocoppie è stata in seguito variata. Come detto precedentemente, esse sono state disposte inizialmente in modo sparso. La temperatura del prodotto media che ne risultava era determinata, pertanto, da tutte le tre possibili tipologie di un flacone all'interno della camera: flacone centrale, flacone centrale a contatto con flaconi di bordo e flacone di bordo. Per cercare di ottenere risultati migliori, facendo sì che tutti i flaconi si comportassero come i flaconi centrali, la disposizione delle termocoppie è stata cambiata, adoperando inizialmente cinque termocoppie disposte solo nei flaconi centrali (assicurandoci che la temperatura del flacone centrale non a contatto con i flaconi di bordo fosse monitorata), per poi terminare la restante parte del lavoro adoperando solo due termocoppie, di cui una posizionata nel flacone centrale non a contatto con flaconi di bordo, e l'altra posizionata in un flacone centrale a contatto con i flaconi di bordo. In Figura 2.17, Figura 2.18 e Figura 2.19 sono mostrate le disposizioni delle termocoppie (indicate in rosso) utilizzate durante il lavoro di Tesi.



**Figura 2.17** Disposizione “sparse” delle termocoppie.



**Figura 2.18** Disposizione “centrali (5)” delle termocoppie.



**Figura 2.19** Disposizione “centrali (2)” delle termocoppie.

Con la disposizione di solo due termocoppie centrali sono state effettuate prove utilizzando due temperature di ripiano (0 e  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e due pressioni in camera di essiccamento (60 e 90 mTorr) durante la fase di essiccamento primario.

Al termine di questa serie di prove condotte adottando la nucleazione spontanea è stato deciso di osservare l'effetto che la nucleazione controllata avesse sul processo. Pertanto, le ultime prove, condotte con la disposizione di solo due termocoppie centrali, sono state ripetute andando a variare le condizioni di nucleazione durante la fase di congelamento, facendo avvenire la nucleazione controllata ad una temperatura di  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Le prove condotte con nucleazione spontanea avevano una durata complessiva di circa 8 ore e 30 minuti, di cui 2 ore e 15 minuti dedicati al congelamento, e la restante parte all'essiccamento primario. La durata delle prove con nucleazione controllata era, per la maggior parte delle prove condotte con questa modalità, di circa 10 ore. Il tempo aggiuntivo adoperato rispetto alle prove con nucleazione spontanea è stata interamente indirizzato alla fase di congelamento, per raggiungere la temperatura di  $-5^{\circ}\text{C}$  e mantenerla per un tempo sufficientemente lungo per

permettere che la maggioranza dei flaconi raggiungesse quella temperatura (in alcune prove la fase ad una temperatura a  $-5^{\circ}\text{C}$  è stato protratta per circa 2 ore). La durata dell'essiccamento primario è stata variata in sole 3 prove, in cui la fase è durata 2 ore, 4 ore, o 19 ore, mantenendola fissa a 6 ore per tutte le altre prove.

L'essiccamento secondario non è stato condotto in questo lavoro.

La soluzione utilizzata è stata la medesima per l'intero ciclo di prove. Ogni flacone veniva riempito con 3 ml di soluzione, di cui il 5% in peso costituito da saccarosio, e la restante parte da acqua distillata. Una volta posizionate i 19 flaconi all'interno della camera di essiccamento veniva avviata la ricetta da programma, al termine della quale i flaconi venivano estratti e pesati uno ad uno privandoli dei tappi e asciugati, in modo da rimuovere la condensa eventualmente formata.

In seguito, raccolti i dati forniti dalla macchina e misurate le variazioni di peso dovute alla sublimazione dell'acqua durante l'essiccamento primario, ogni prova è stata analizzata per valutare l'efficienza della ricetta nell'abbassare il più possibile la deviazione standard sulle perdite di peso. Le analisi sono state effettuate principalmente sulle perdite di peso di tutti i flaconi, ma analisi aggiuntive sono state condotte sui flaconi a seconda della loro posizione. È stata controllata la perdita di peso e la relativa deviazione standard solo sui flaconi centrali e solo sui flaconi esterni, ed è stata valutata anche l'influenza delle termocoppie sulla deviazione standard dei flaconi totali, rimuovendo dai calcoli i flaconi che le contenevano.

Un altro parametro osservato è stato quello della percentuale di calore ricevuta dal ripiano, rispetto a quello totale ricevuto dai flaconi. Il *MicroFD*®, come è stato precedentemente detto, rileva il calore scambiato tra flaconi e ripiano, tramite il sensore di flusso *Accuflux*®. Se tale calore fosse utilizzato interamente per la sublimazione del ghiaccio, si dovrebbe ottenere un rapporto unitario fra il calore rilevato e quello necessario alla sublimazione della massa persa dai flaconi. Questo non si presentava, indice del fatto che il calore ricevuto dai flaconi non fosse interamente proveniente dal ripiano, ma che avesse anche altre origini. Pertanto, è stato calcolato il contributo di calore effettivo fornito dal ripiano come rapporto fra il calore letto dalla macchina (calcolato come un integrale per tutto il tempo dell'essiccamento primario, in quanto essa fornisce un valore al minuto) e il calore effettivamente necessario per sublimare l'acqua rimossa dai flaconi. Le equazioni che permettono di calcolare il valore di %Q sono la (2.2) e la (2.3):

$$\%Q = \frac{Q_{SHELF, ACCUM}}{\Delta H_s \cdot \Delta m} \quad (2.2)$$

con

$$Q_{SHELF, ACCUM} = \int_0^M (Q_{ACCUFLUX}) dt \quad (2.3)$$

dove l'intervallo di integrazione corrisponde al tempo totale dell'essiccamento primario,  $Q_{ACCUFLUX}$  corrisponde al calore misurato dalla macchina,  $\Delta H_s$  è il calore di sublimazione dell'acqua e  $\Delta m$  la perdita di massa misurata per via gravimetrica. Dai risultati mostrati è possibile osservare come questa percentuale sia sempre inferiore al 70%.

Oltre all'eterogeneità legata alla perdita di massa, si è analizzata anche quella legata alle diverse temperature raggiunte durante la fase di essiccamento primario dal prodotto nei differenti flaconi. Questa è stata valutata andando ad osservare la massima differenza di temperatura che si instaurava fra il flacone con temperatura minima e quello con temperatura massima. Naturalmente, questa valutazione è la più soggetta ad errori a causa delle poche termocoppie utilizzate in alcune prove.

Le varie prove sono state inizialmente analizzate per via grafica, confrontando l'impatto che ogni variabile (temperatura ripiano, pressione camera, etc.) avesse sul processo e sull'omogeneità del batch (perdita di peso media e sua deviazione standard, % $Q$  definito come nell'equazione (2.2) e differenza di temperatura massima all'interno del batch a stato stazionario), mantenendo costanti le altre variabili.

In alcune prove è stata valutata la differenza fra la temperatura del *LyoSim*® effettivamente a contatto con i flaconi e quella indicata dal *software*, misurando, tramite l'uso di termocoppie poste sull'anello stesso, la temperatura della superficie in contatto con i flaconi esterni. È stata inoltre valutata la differenza di temperatura fra i vari blocchi dell'anello e l'uniformità assiale lungo la faccia del singolo blocco.

### 2.3 Analisi PLS

L'analisi PLS è stata effettuata considerando come variabili  $X$ :

- la temperatura del ripiano;
- la pressione della camera;
- la temperatura dell'anello;
- la disposizione delle termocoppie all'interno del *batch*;
- l'utilizzo di nucleazione controllata o spontanea;

come variabili  $Y$ :

- la temperatura media del prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario;
- la percentuale di calore che ricopriva quello derivante dal ripiano rispetto a quello totale necessario alla sublimazione del prodotto;
- la perdita di peso media di prodotto, considerando l'intero *batch*, solo i flaconi interni o solo i flaconi esterni;
- la deviazione standard sulla perdita di peso dell'intero *batch*, dei soli flaconi interni o dei soli flaconi esterni;
- la differenza fra le perdite di peso dei flaconi esterni e quelli interni;

Il modello PLS è stato programmato e utilizzato attraverso il *software Matlab*®.



### 3 Risultati

I risultati mostrati nelle sezioni seguenti sono stati organizzati per mostrare gli effetti dei parametri caratterizzanti il processo.

Nella sezione 3.1 si mostra l'efficienza del *LyoSim*® in termini di temperatura effettivamente presente sulla superficie dell'anello.

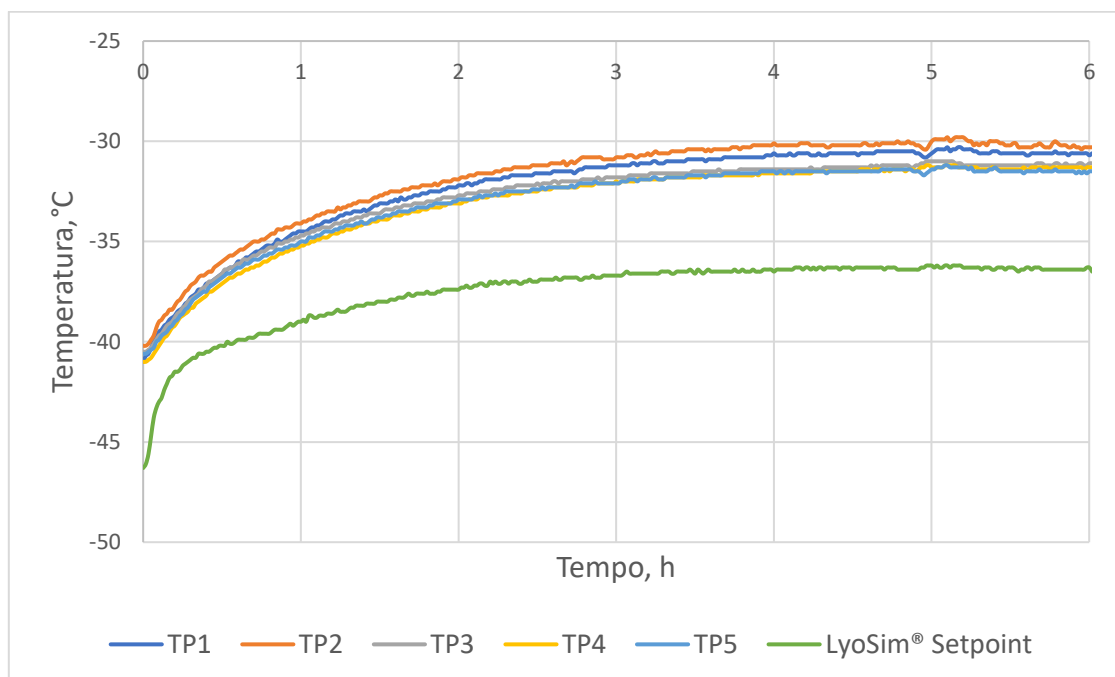
Nella sezione 3.2 sono mostrati per intero i risultati ottenuti da prove identiche tranne che per la temperatura dell'anello. Si analizza anche l'effetto della temperatura dell'anello al variare della disposizione delle termocoppie all'interno del *batch*.

Nella sezione 3.3 sono mostrati i risultati per evidenziare rapidamente gli effetti che gli altri parametri hanno sul processo, quali temperatura del ripiano, pressione della camera, utilizzo di nucleazione controllata etc.

Nella sezione 3.4 verranno invece mostrati i risultati relativi all'analisi statistica PLS.

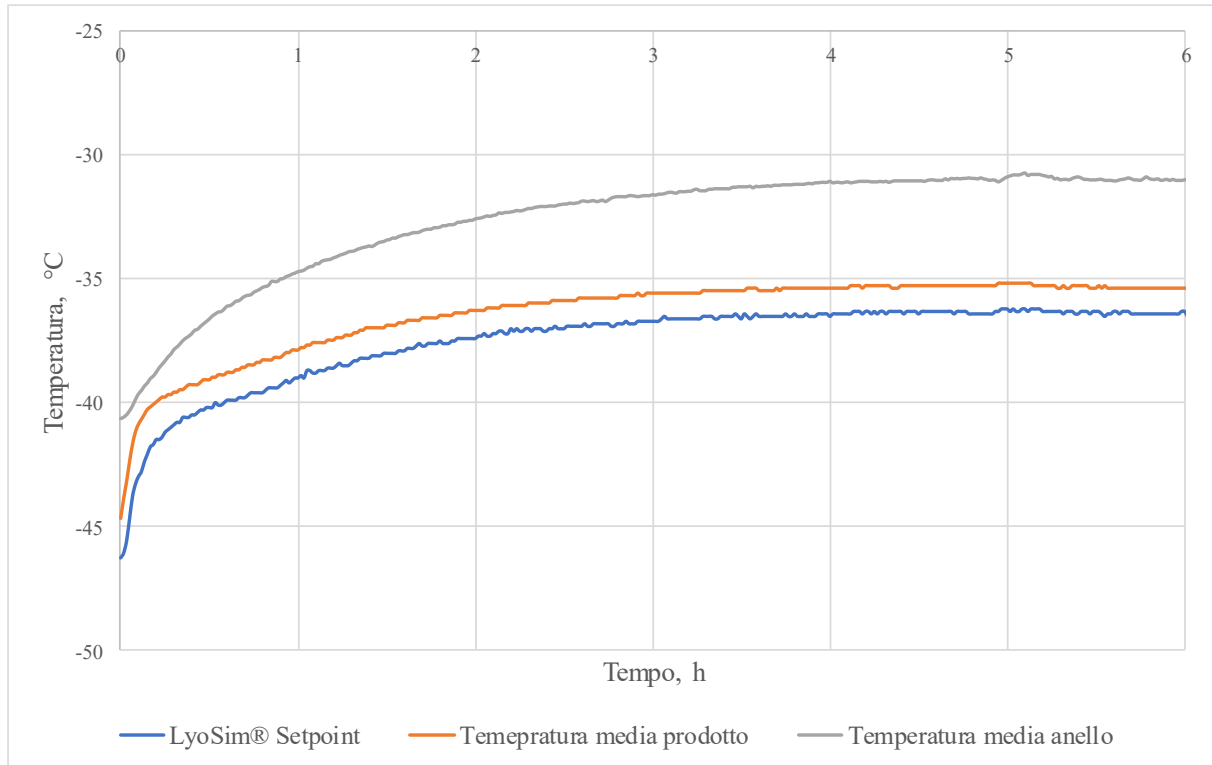
#### 3.1 Temperatura del *LyoSim*®

Precedentemente è stato descritto come la temperatura dell'anello è determinabile durante il processo. Essa viene impostata in un intervallo fra  $\pm 15^\circ\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto rilevata dalle termocoppie  $T_{P,avg}$ . Si è deciso, però, di misurare durante una prova l'effettiva temperatura delle pareti dell'anello a contatto con i flaconi tramite l'utilizzo di cinque termocoppie, per confrontarla con la temperatura del fluido che scorre all'interno dell'anello rilevata dal *MicroFD*®. Le cinque termocoppie sono state poste centralmente su ogni faccia dei blocchi costituenti l'anello. In Figura 3.1 è rappresentato l'andamento della temperatura rilevata dalle termocoppie durante la fase di essiccamento primario.



**Figura 3.1** Andamento della temperatura sulle facce del *LyoSim*® durante la fase di essiccamento primario.

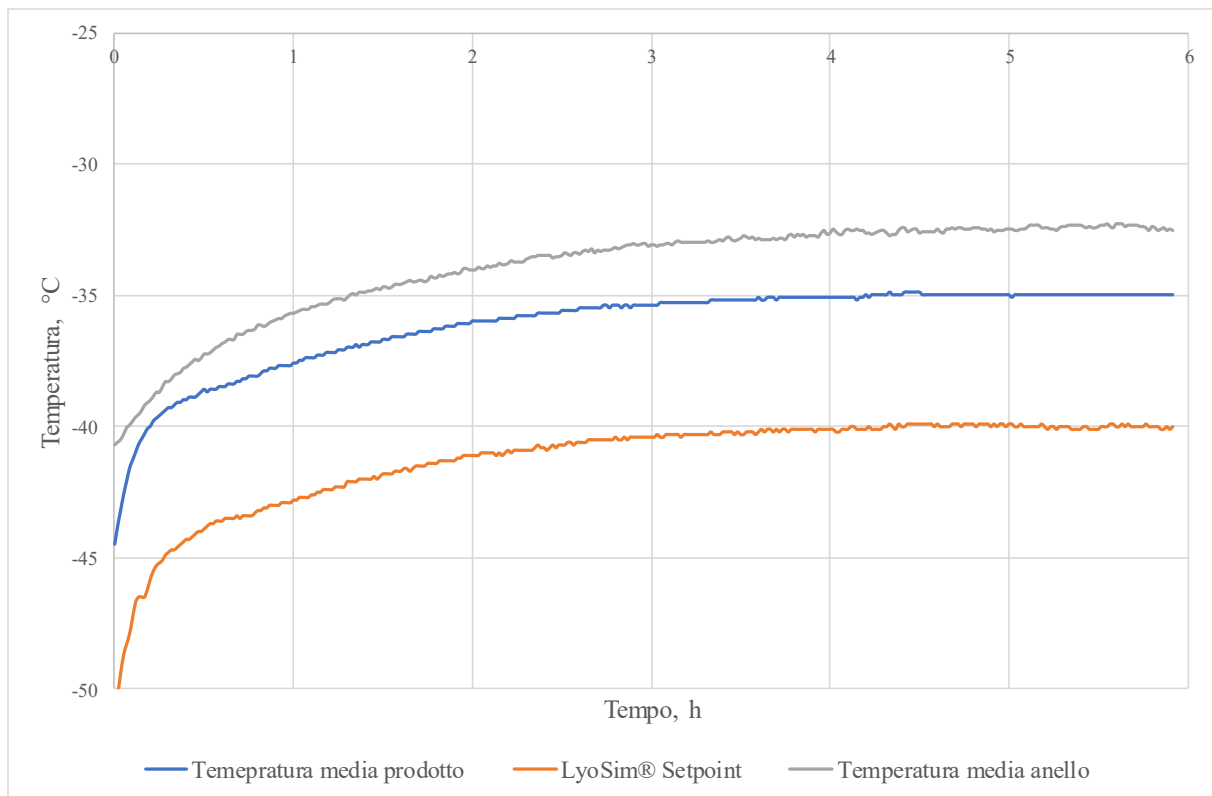
Le varie “TP” sono le termocoppie sull’anello, mentre “*LyoSim*® *Setpoint*” indica la temperatura rilevata dal *MicroFD*®. Si nota come ci sia una differenza di temperatura di circa 6°C fra la temperatura sull’anello e quella del fluido. In Figura 3.2 viene mostrata quale conseguenza ha questa differenza di temperatura sul processo.



**Figura 3.2** Confronto delle temperature dell’anello e della temperatura media del prodotto. Temperatura del *LyoSim*® impostata a -1°C rispetto la temperatura media del prodotto.

Nella prova in esame la temperatura del *LyoSim*® è stata impostata affinché avesse 1°C in meno rispetto la temperatura media del prodotto. Dal grafico è possibile notare che la temperatura sulla superficie dell’anello è sempre maggiore rispetto a quella media del prodotto. Ciò che risulta è che il *LyoSim*®, invece di raffreddare i flaconi esterni, in questa prova li riscalda.

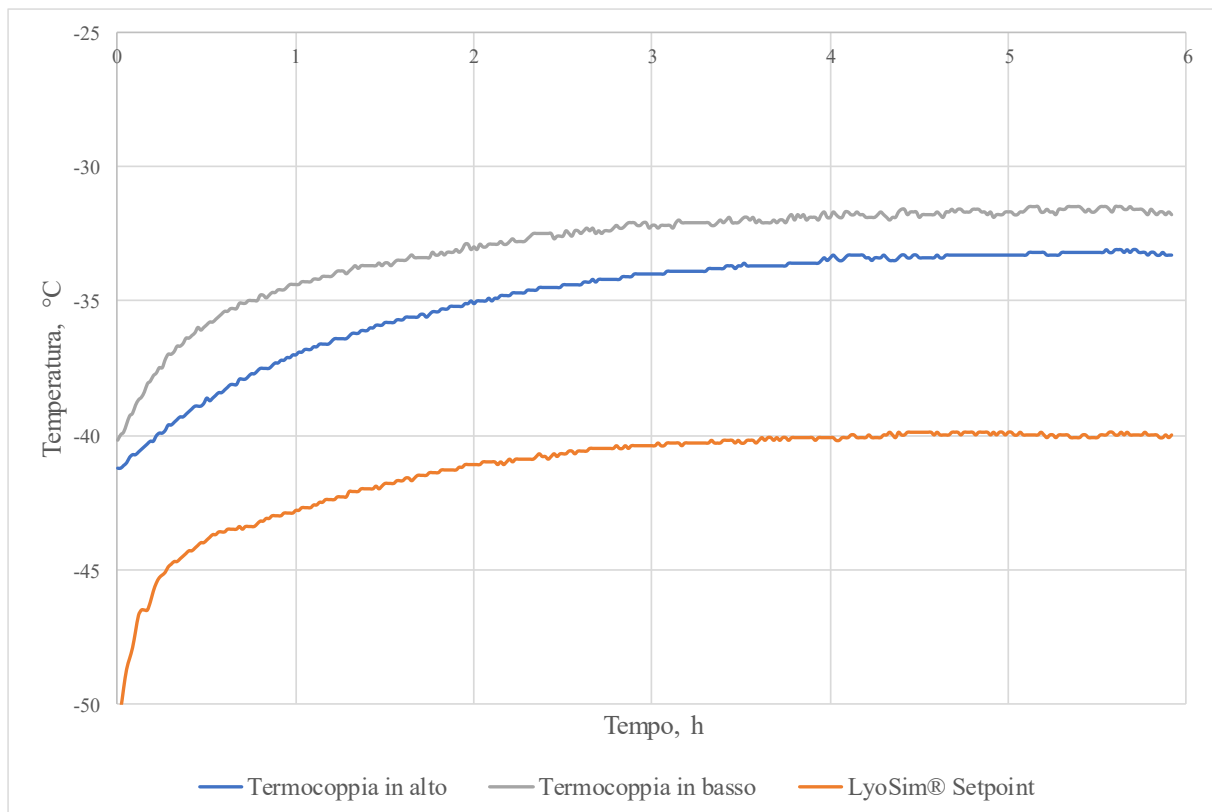
Si mostra, in Figura 3.3, il comportamento nel caso in cui la temperatura del *LyoSim*® è impostata per avere 5°C in meno rispetto la temperatura media del prodotto.



**Figura 3.3** Confronto delle temperature dell'anello e della temperatura media del prodotto. Temperatura del *LyoSim*® impostata a -5°C rispetto la temperatura media del prodotto.

Sebbene anche in questo caso la temperatura sulla superficie dell'anello sia più alta rispetto alla temperatura media del prodotto, la differenza fra le due è di circa 2°C durante la fase stazionaria dell'essiccamento primario, mentre nel precedente caso si raggiunge una differenza di circa 5°C.

Un'altra analisi effettuata sul comportamento dell'anello è stata quella di verificare i gradienti di temperatura assiali. In questo caso sono state utilizzate solo due termocoppie, entrambe poste sulla superficie di due blocchi formanti l'anello. Una di esse è stata posta prossima al ripiano, corrispondente a quella a contatto con il prodotto, l'altra in cima al blocco. Il risultato è presentato in Figura 3.4.



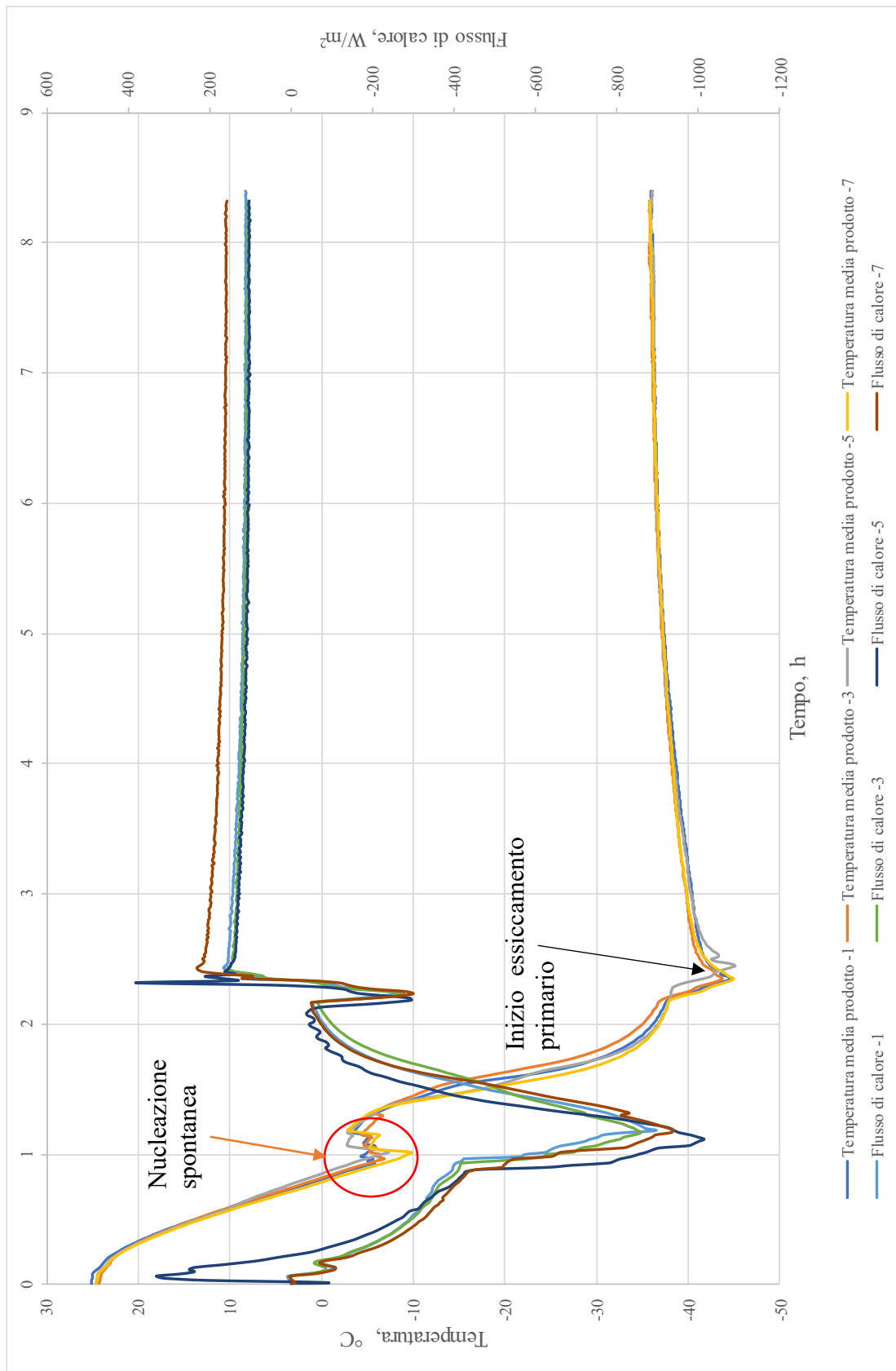
**Figura 3.4** Confronto delle temperature assiali dell'anello. La termocoppia posta in basso è quella più vicina al ripiano.

Si riscontra che la termocoppia posta in alto, ha una temperatura inferiore rispetto la termocoppia più vicina al ripiano.

Questo può spiegare perché la percentuale di calore ricevuta dal fondo non è mai al 100%, ma, anzi sempre inferiore al 70%. Sebbene il ruolo del *LyoSim*® debba essere quello di raffreddare i flaconi esterni per simulare il comportamento di quelle centrali, questo non avviene: in realtà, le riscalda.

### 3.2 Effetto del *LyoSim*® sul processo

Una particolare attenzione deve essere posta sull'effetto che la temperatura dell'anello del *MicroFD*® ha sul processo a parità di altri parametri. Come esempio sono mostrati i risultati di quattro prove condotte esattamente alle stesse condizioni di temperatura del ripiano, pari a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e pressione della camera, pari a 60 mTorr, durante l'essiccamento primario, con l'unica differenza della temperatura dell'anello utilizzata rispetto la temperatura media del prodotto durante l'essiccamento primario, a cui, oltre la classica tripletta  $-1$ ,  $-3$  e  $-5^{\circ}\text{C}$ , è stata affiancata l'unica prova condotta ad una temperatura dell'anello pari a  $-7^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto. L'essiccamento primario è stato fatto durare 6 ore, mentre il congelamento circa 2 ore e 30 minuti. In queste quattro prove i flaconi monitorati erano in totale cinque e centrali (disposizione come in Figura 2.18). In Figura 3.5 è mostrato l'andamento delle prove in termini di temperatura media del prodotto e flusso di calore. Si ricorda che durante la fase di congelamento la temperatura del *LyoSim*® viene mantenuta sempre a  $-1^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto.



**Figura 3.5** Grafico che mostra l'andamento della temperatura media del prodotto e del flusso di calore rilevato da *Accuflux*® per tre prove cicli condotti in maniera identica salvo la temperatura del *LyoSim*® impostata a -1°C, -3°C, -5 e -7°C rispetto la temperatura media del prodotto.

Dal grafico risulta evidente che l'andamento della temperatura media del prodotto e del flusso di calore è praticamente indipendente dalla temperatura del *LyoSim*® impostata

Nel grafico è evidenziato in rosso il fenomeno di nucleazione spontanea che avviene durante il congelamento nelle tre prove a cui corrisponde il picco nel flusso di calore. L'andamento delle temperature durante la fase di congelamento è dovuto ai diversi momenti di nucleazione dei prodotti nei diversi flaconi monitorati dalle termocoppie.

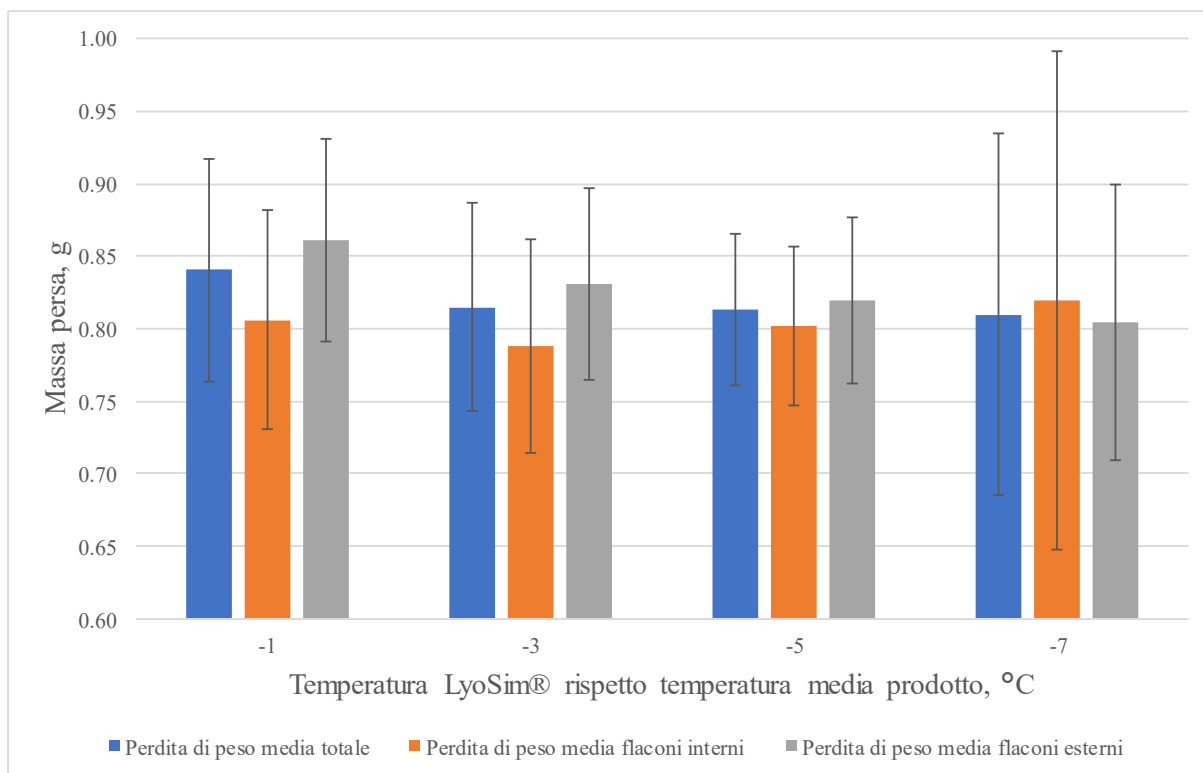
La temperatura media del prodotto raggiunta durante l'essiccamento primario è identica e pari a -36°C.

I valori di %Q delle tre prove sono pari al 43% per le prove condotte ad una temperatura dell'anello di -1°C e -3°C rispetto la temperatura media del prodotto, pari al 41% per la prova condotta a -5°C e pari al 64% per la prova condotta a -7°C. L'unico risultato inusuale è quello della prova condotta a -5°C, in quanto avendo meno calore proveniente dall'anello il calore ricevuto dal ripiano dovrebbe svolgere un ruolo più importante nella sublimazione dell'acqua, risultato concorde con quello ottenuto nella prova condotta a -7°C. Tuttavia la differenza fra i valori di %Q è minima e potrebbe essere dovuta unicamente ad errori sperimentali in quanto altamente dipendente dal corretto funzionamento delle termocoppie. Riferendoci ai risultati mostrati nella sezione 3.1, relativa all'effettiva temperatura del *LyoSim*®, non sorprende che il valore di %Q ottenuto sia relativamente basso.

In Tabella 3.1 sono mostrati i risultati numerici relativi alle perdite di peso e delle deviazioni standard delle quattro prove, presentati graficamente in Figura 3.6.

**Tabella 3.1** Risultati di tre prove condotte a diversa temperatura dell'anello (-1, -3, -5, -7°C rispetto la temperatura media prodotto). Temperatura del ripiano pari a -20°C e pressione della camera pari a 60 mTorr durante l'essiccamento primario. Disposizione di cinque termocoppie centrali all'interno del batch.

Temperatura anello rispetto temperatura media	-1	-3	-5	-7	
Perdita di peso media, g	0.84	0.81	0.81	0.81	totale
Deviazione Standard [-]	7.70%	7.20%	5.23%	12.51%	
Perdita di peso media, g	0.81	0.79	0.80	0.82	solo flaconi interni
Deviazione Standard [-]	7.57%	7.34%	4.16%	17.19%	
Perdita di peso media, g	0.86	0.83	0.82	0.80	solo flaconi esterni
Deviazione Standard [-]	7.00%	6.66%	5.76%	9.53%	



**Figura 3.6** Perdita di peso media dell'intero *batch*, dei soli flaconi interni e dei soli flaconi esterni per quattro prove condotte con le medesime condizioni eccetto la temperatura del *LyoSim*® rispetto la temperatura media del prodotto. Sono mostrate attraverso le barre di errore le deviazioni standard dei singoli risultati. Disposizione di cinque termocoppie centrali all'interno del *batch*.

Se si osservasse solo la perdita di peso dell'intero *batch* il risultato non evidenzierebbe il ruolo dell'anello nel processo, in quanto tutte e quattro le prove hanno avuto una perdita di peso media totale praticamente identica. Il ruolo del *LyoSim*® risalta se si osservano le perdite di peso relative ai flaconi interni ed esterni. La temperatura più bassa dell'anello influenza maggiormente la perdita di peso dei flaconi esterni rispetto quelli interni, ma tende a far convergere le perdite di peso. In pratica, l'abbassamento della temperatura genera una perdita di peso fra i flaconi nel *batch* più omogenea, facendo comportare i flaconi esterni più come quelli interni. Con l'utilizzo della temperatura dell'anello pari a  $-1^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto fra la perdita di peso media dei flaconi esterni e quella dei flaconi interni c'è una differenza di 0,06 g (pari al 6% di perdita in peso in meno nei flaconi interni rispetto quelli esterni), mentre una temperatura dell'anello impostata a  $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto comporta una differenza fra flaconi interni ed esterni di solo 0,02 g (pari al 2% di perdita in peso in meno nei flaconi interni rispetto quelli esterni). Con una temperatura dell'anello impostata a  $-7^{\circ}\text{C}$  sono i flaconi interni a ricevere una maggior perdita di peso, invertendo quello che avveniva a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

La deviazione standard sulla perdita di peso si abbassa con l'abbassamento della temperatura dell'anello, salvo con la prova a  $-7^{\circ}\text{C}$ , in cui aumenta di netto, la cui ragione potrebbe essere dovuta ad errori sperimentali.

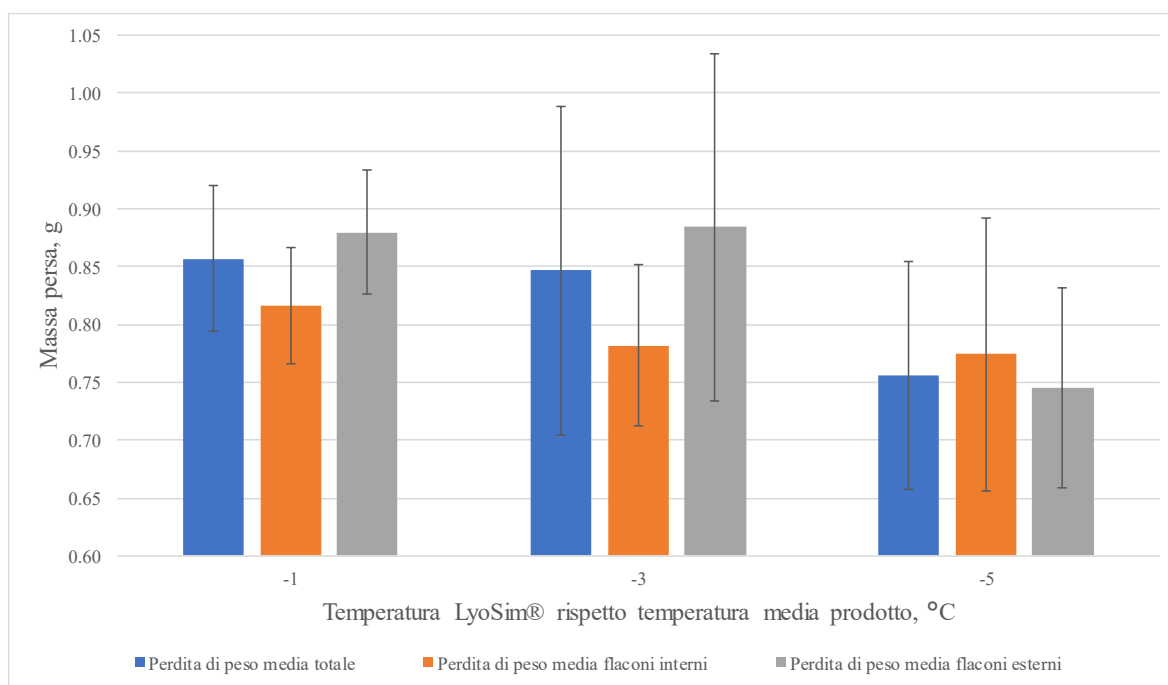
### 3.2.1 Effetto disposizione termocoppie

Dopo aver visto l'effetto che l'anello ha sul processo utilizzando cinque termocoppie centrali, è interessante osservare quale sia il suo effetto quando le termocoppie sono disposte in ordine sparso, disposte come in Figura 2.17.

Per quanto riguarda le perdite di peso che si ottengono in prove identiche con termocoppie disposte in ordine sparso tranne che per la temperatura dell'anello rispetto la temperatura media del prodotto, i risultati sono presentati in Tabella 3.2 e in Figura 3.7.

**Tabella 3.2** Risultati di tre prove condotte a diversa temperatura dell'anello (-1, -3, -5°C rispetto la temperatura media prodotto). Temperatura del ripiano pari a -20°C e pressione della camera pari a 60 mTorr durante l'essiccamento primario. Disposizione di cinque termocoppie sparse all'interno del batch.

Temperatura anello rispetto temperatura media	-1	-3	-5	
Perdita di peso media, g	0.86	0.85	0.76	totale
Deviazione Standard [-]	6.3%	14.2%	9.8%	
Perdita di peso media, g	0.82	0.78	0.77	solo flaconi interni
Deviazione Standard [-]	5.0%	7.0%	11.8%	
Perdita di peso media, g	0.88	0.88	0.74	solo flaconi esterni
Deviazione Standard [-]	5.4%	15.0%	8.6%	

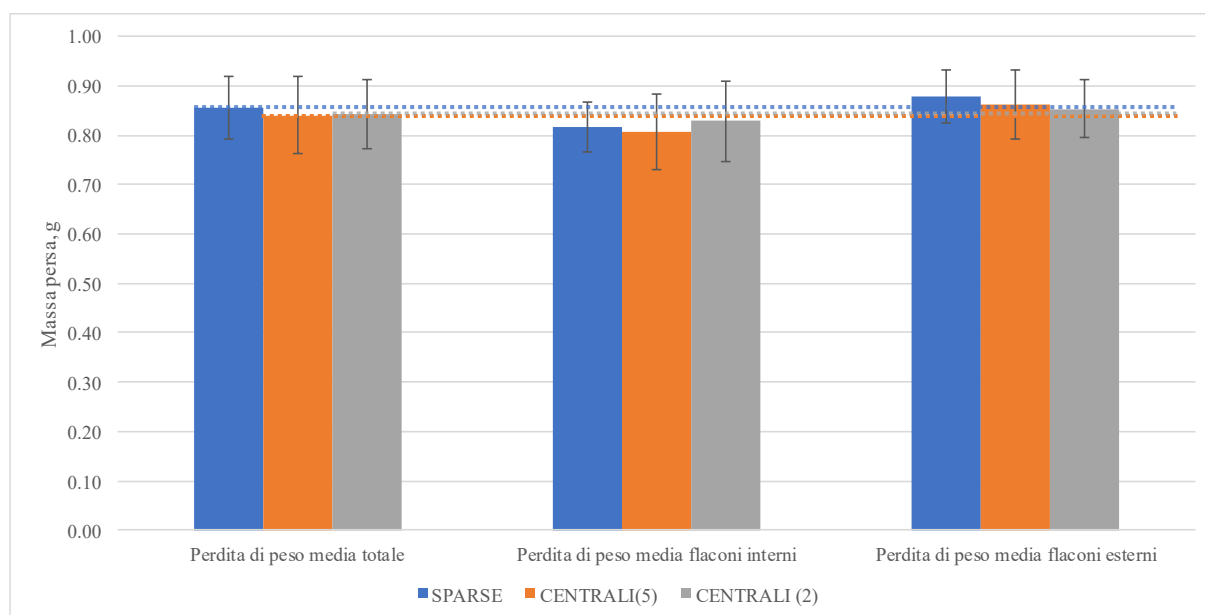


**Figura 3.7** Perdita di peso media dell'intero *batch*, dei soli flaconi interni e dei soli flaconi esterni per tre prove condotte con le medesime condizioni eccetto la temperatura del *LyoSim®* rispetto la temperatura media del prodotto. Sono mostrate attraverso le barre di errore le deviazioni standard dei singoli risultati. Disposizione di cinque termocoppie sparse all'interno del *batch*.



Sebbene nella prova condotta a  $-5^{\circ}\text{C}$  ci sia una perdita di peso inferiore rispetto agli altri casi, questo può essere dovuto ad un semplice errore sperimentale. Si nota, anche in questo caso la tendenza dei flaconi esterni a comportarsi in modo più simile a quelli interni all'abbassamento della temperatura del *LyoSim*® rispetto la temperatura media del prodotto.

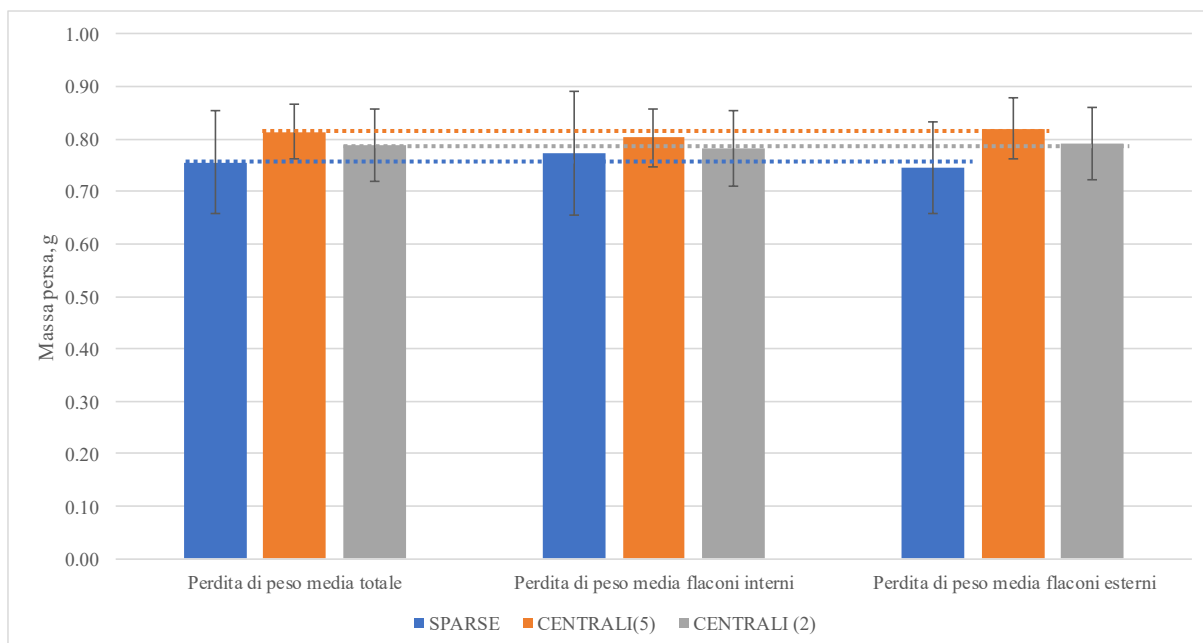
Per far sì che il *LyoSim*® sia controllato maggiormente dalla temperatura del flacone centrale, nella ultima parte di prove effettuate è stato deciso di adottare l'utilizzo di solo due termocoppie poste con la disposizione mostrata in Figura 2.19. Pertanto, si mostrano i confronti dell'utilizzo delle diverse disposizioni delle termocoppie. Per questa analisi sono state considerate tre prove in cui è stata utilizzata una temperatura di ripiano pari a  $-20^{\circ}\text{C}$  e una pressione pari a 60 mTorr durante l'essiccamento primario, con una temperatura dell'anello impostata per tutte e tre le prove pari a  $-1^{\circ}\text{C}$ . Risultati presentati in Figura 3.8.



**Figura 3.8** Confronto della perdita di peso media in prove condotte con disposizione delle termocoppie differenti. I valori delle perdite di peso medie dell'intero *batch* sono mostrate anche con i segmenti tratteggiati per mostrare la differenza con le perdite di peso medie dei flaconi interni ed esterni. Temperatura dell'anello posta a  $-1^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie.

La perdita di peso, indifferentemente dai flaconi considerati, risulta poco influenzata dalla disposizione delle termocoppie. Quello che risalta è come nel caso di utilizzo di due termocoppie centrali, anche con l'uso di una temperatura dell'anello più alta ( $-1^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie), i flaconi esterni si comportano molto più similmente a quelli interni, mentre lo scarto massimo si ha con l'utilizzo di termocoppie disposte in ordine sparso.

Utilizzando una temperatura più bassa dell'anello ( $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie) quello che risulta è che i flaconi interni ed esterni si comportano in modo praticamente identico con l'utilizzo della disposizione centrale delle termocoppie (indifferentemente se ne vengono usate due o cinque), mentre con la disposizione sparsa la differenza fra flaconi interni ed esterni (seppur minima con temperature più basse dell'anello) risulta più evidente. I risultati sono mostrati in Figura 3.9.



**Figura 3.9** Confronto della perdita di peso media in prove condotte con disposizione delle termocoppie differenti. I valori delle perdite di peso medie dell'intero *batch* sono mostrate anche con i segmenti tratteggiati per mostrare la differenza con le perdite di peso medie dei flaconi interni ed esterni. Temperatura dell'anello posta a  $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie.

Dai grafici risulta anche che la deviazione standard cresce maggiormente con l'utilizzo di termocoppie disposte in modo sparso, specialmente con una temperatura dell'anello più bassa. Questo è comprensibile, in quanto il ruolo dell'anello è quello di abbassare la temperatura dei flaconi più esterni che ricevono più calore. Se la temperatura è letta considerando anche i flaconi esterni, la temperatura media risultante sarà maggiore di quella ideale per il controllo della temperatura dell'anello, seppur di poco. Pertanto l'effetto di bordo non è limitato come nel caso in cui si tenga conto solo della temperatura dei flaconi centrali.

Tuttavia, quando la temperatura dell'anello è impostata a  $1^{\circ}\text{C}$  in meno rispetto la temperatura media letta dalle termocoppie, l'utilizzo di termocoppie disposte in ordine sparso risulta in una deviazione standard inferiore rispetto alle disposizioni centrali.

### 3.3 Effetti dei parametri caratterizzanti il processo

Le prove analizzate per mostrare l'effetto della temperatura del ripiano, della pressione della camera e della disposizione delle termocoppie sono state tutte realizzate in condizioni di nucleazione spontanea.

Per sinteticità, in questo paragrafo, con *tripletta* di prove si intende un gruppo di tre prove i cui parametri utilizzati nella ricetta sono i medesimi ad eccezione della temperatura del *LyoSim*® che sarà impostata a  $-1$ ,  $-3$  e  $-5^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto rilevata dalle termocoppie.

In Figura 3.10 si mostra la classica ricetta seguita di una prova con nucleazione spontanea.

FREEZING											FINAL FREEZE					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Shelf	°C	Hold Time	min	Primary Vac Start	mT
Shelf	°C	20	20	-40	-40	0	0	0	0	0	°C	-40.0	min	10	mT	60
Time	min	0	10	60	60	0	0	0	0	0						
LyoSim	Track From:	▼		9	Track Offset:	-1.0		°C								

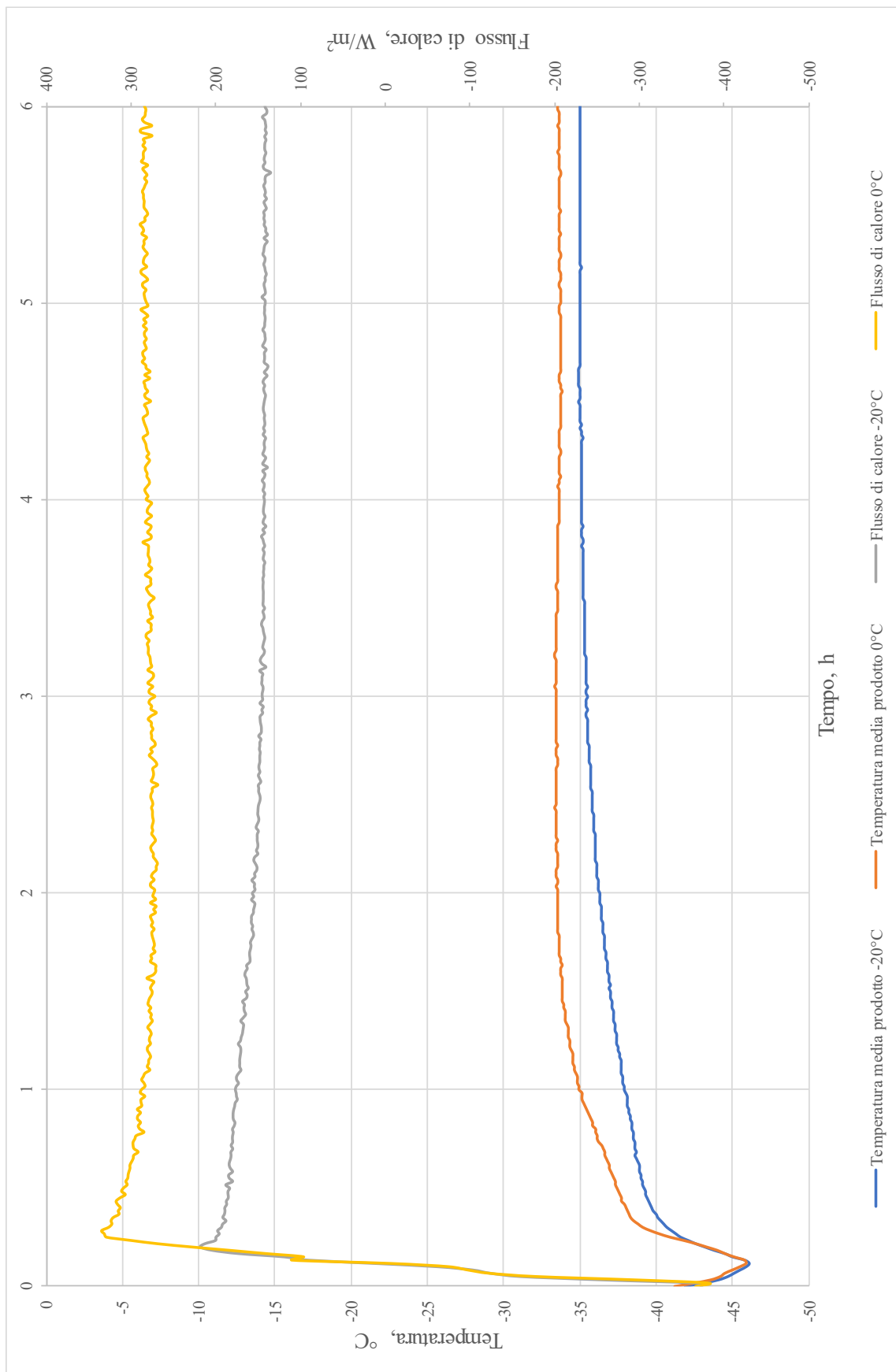
PRIMARY DRYING																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Shelf	°C	-20	-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Time	min	0	360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Vacuum	mT	60	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
LyoSim	Track From:	▼		9	Track Offset:	-3.0		°C										
																Auto EOPD	mT	DISABLED

**Figura 3.10** Classica ricetta *Analyze*, in cui si verifica nucleazione spontanea.

### 3.3.1 Effetto temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario

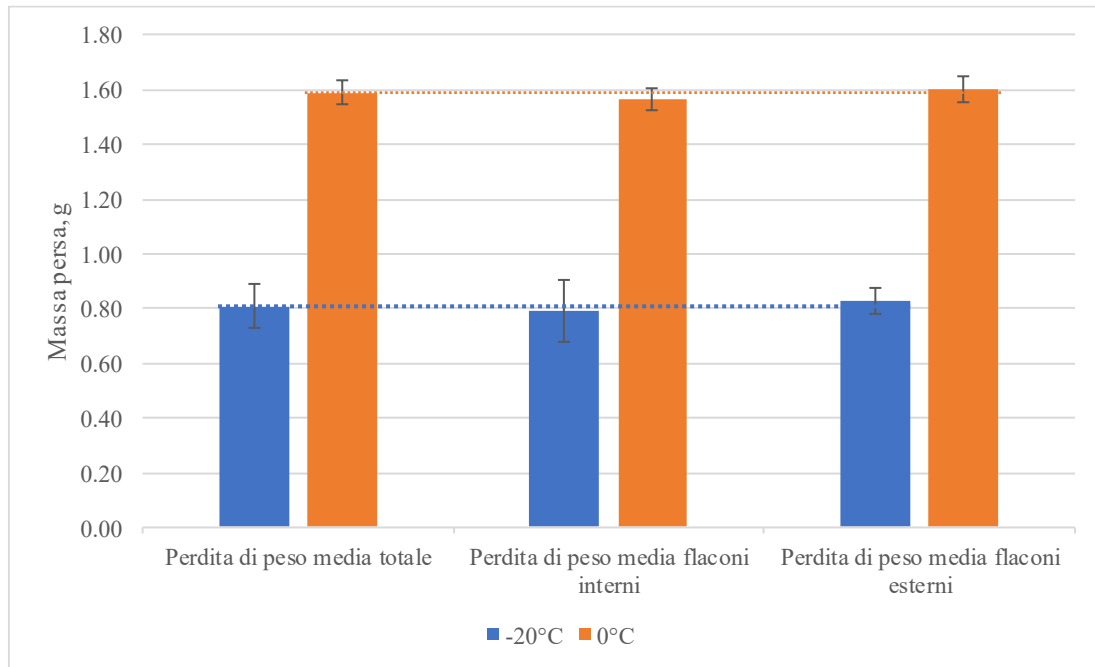
Per mostrare l'effetto della temperatura del ripiano utilizzata durante la fase dell'essiccamento primario si mostrano due triplette di prove condotte a due temperature del ripiano differenti. Una tripla condotta a  $-20^{\circ}\text{C}$ , l'altra condotta  $0^{\circ}\text{C}$ . La pressione durante la fase di essiccamento primario è stata mantenuta costante e pari a 60 mTorr, così come la tipologia di flaconi (tubolari) e la disposizione delle termocoppie.

L'aumento della temperatura del ripiano comporta una temperatura maggiore del prodotto e un maggior flusso di calore durante l'essiccamento primario, come mostrato in Figura 3.11. L'aumento della temperatura del ripiano comporta, quindi, anche una percentuale di calore dal fondo più alta, in quanto maggiore è la temperatura del ripiano maggiore è il ruolo ricoperto dal calore del ripiano sul calore totale ricevuto dal prodotto, passando da un  $\%Q$  pari al 33% nel caso di una temperatura del ripiano a  $-20^{\circ}\text{C}$  al 55% nel caso di temperatura del ripiano pari a  $0^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.11** Andamento delle temperature e dei flussi di calore durante la fase dell'essiccamento primario per due prove identiche in ogni parametro tranne che nella temperatura del ripiano.

Nel dettaglio si mostrano i risultati di due prove condotte con diversa temperatura del ripiano in Figura 3.12

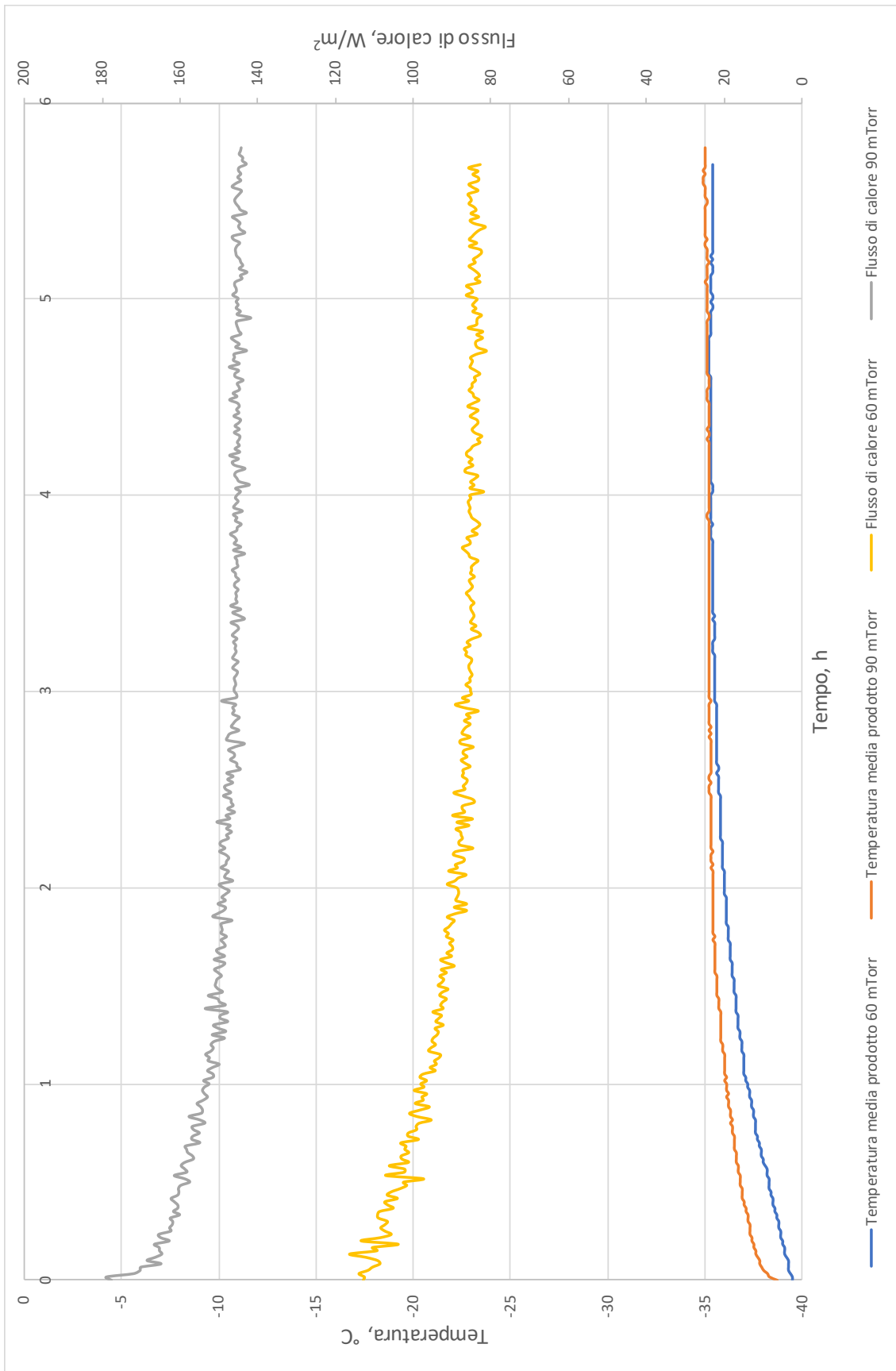


**Figura 3.12** Confronto della perdita di peso media in prove condotte con temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario differente. I valori delle perdite di peso medie dell'intero *batch* sono mostrate anche con i segmenti tratteggiati per mostrare la differenza con le perdite di peso medie dei flaconi interni ed esterni. Temperatura dell'anello posta a -3°C rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie.

I risultati mostrano una conseguenza intuitiva dell'utilizzo di una temperatura più alta durante la fase di essiccamento primario: la perdita di peso di prodotto è superiore (pari a circa il doppio) nell'uso di una temperatura pari a 0°C rispetto a -20°C. La differenza di perdita di peso fra flaconi interni ed esterni non è influenzata dall'aumento della temperatura. Ciò che si nota, però, con l'aumento della temperatura è che, a parità di temperatura dell'anello, si ha un abbassamento della deviazione standard sulla variazione di peso, indice che con una temperatura maggiore i flaconi tendono a comportarsi in modo maggiormente simile durante il processo.

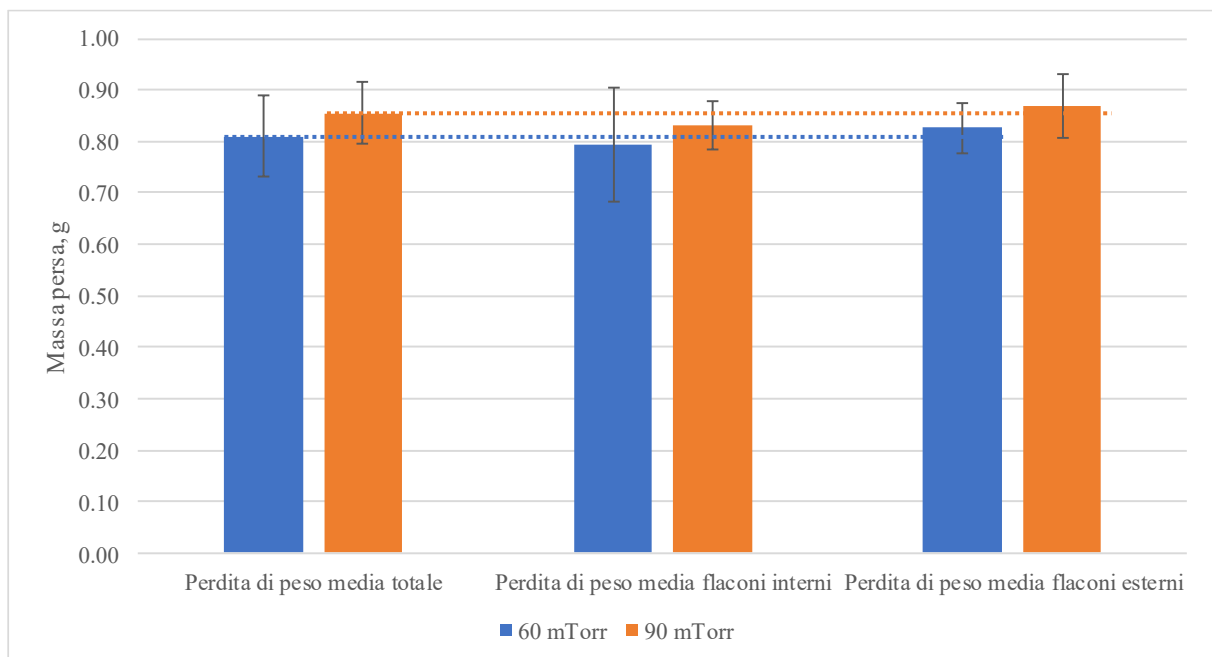
### 3.3.2 Effetto della pressione della camera durante l'essiccamento primario

L'effetto della pressione è stato valutato confrontando due prove condotte in modo identico eccetto la pressione. In Figura 3.13 si mostra l'andamento delle temperature e dei flussi di calore durante l'essiccamento primario delle due prove. Risulta evidente che l'aumento della pressione non influenzi la temperatura media raggiunta dal prodotto allo stazionario, quanto la velocità con cui questa viene raggiunta. Questo è dovuto all'aumento della conducibilità termica del gas che circonda il singolo flacone con l'aumento della pressione. Risulta così che sia il flusso di calore rilevato da *Accuflux*® sia il valore di %*Q* siano maggiori con l'aumento della pressione (il valore di %*Q* a pressione pari a 60 mTorr il suo valore è circa il 33% di quello necessario alla sublimazione della massa di acqua persa, mentre ad una pressione pari a 90 mTorr il suo valore è di circa il 50%).



**Figura 3.13** Andamento delle temperature e dei flussi di calore durante la fase dell'essiccamento primario per due prove identiche in ogni parametro tranne che nella pressione della camera.

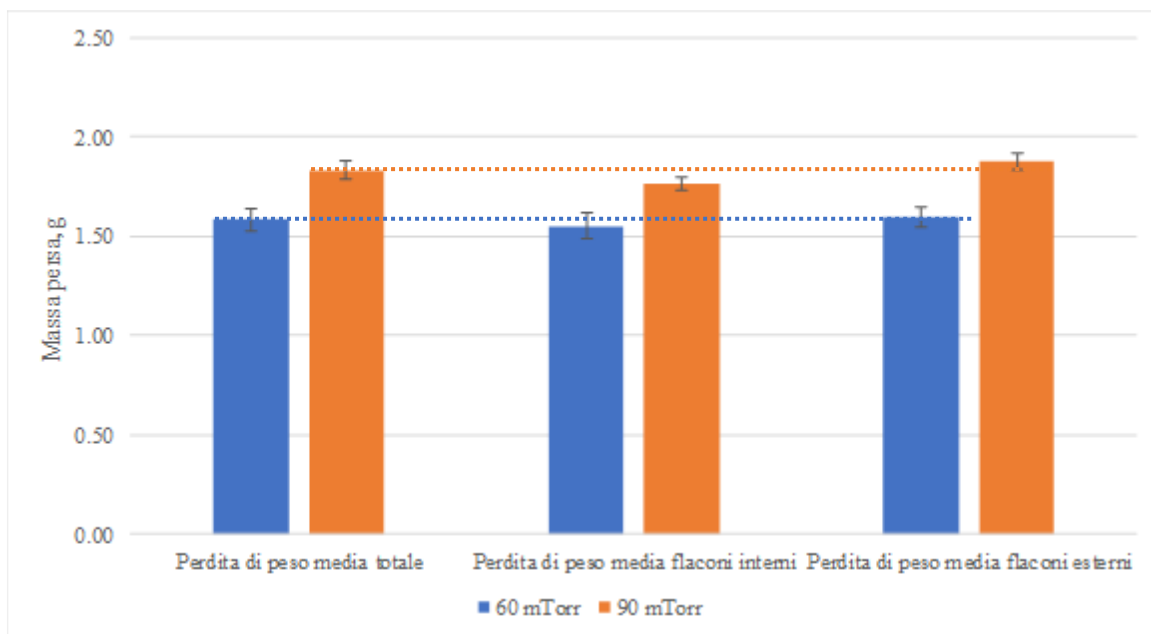
In Figura 3.14 si mostra invece l'andamento delle perdite di peso al variare della pressione. In questo esempio la temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario è stata impostata pari a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.14** Confronto della perdita di peso media in prove condotte ad una pressione durante l'essiccamento primario pari a 60 mTorr e 90 mTorr. Temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario pari a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Sebbene l'aumento della pressione dovrebbe contrastare la sublimazione del ghiaccio, osservazione giustificabile osservando il diagramma di stato dell'acqua (Figura 1.2), il risultato mostrato in Figura 3.14 potrebbe sembrare contraddittorio. La ragione a tale "anomalia" è la medesima discussa precedentemente, cioè la maggior conducibilità termica che assume il gas all'aumentare della pressione. Ciò potrebbe essere indice del fatto che in questo intervallo di pressioni, l'effetto della maggior conducibilità termica del gas abbia più impatto sul processo rispetto all'allontanamento dalla curva di sublimazione in seguito all'aumento della pressione, da ciò una perdita di peso maggiore nel caso di pressione della camera impostata a 90 mTorr. A prova di ciò, si mostrano i risultati ottenuti confrontando due prove identiche alle precedenti (una condotta a 60mTorr, l'altra a 90 mTorr), ma con la temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario pari a  $0^{\circ}\text{C}$ , mostrati in Figura 3.15.

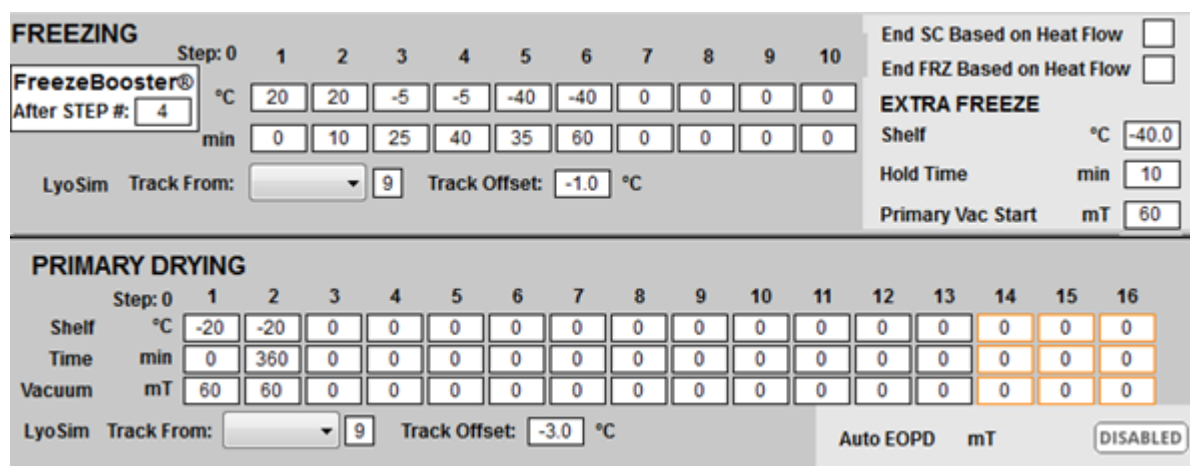
La pressione non influenza, così come l'aumento della temperatura, la differenza di perdite di peso che si riscontra fra flaconi interni ed esterni. Tuttavia, risulta che l'aumento della pressione comporti un abbassamento della deviazione standard, indice che, in generale, i flaconi si comportano in modo più simile durante il processo.



**Figura 3.15** Confronto della perdita di peso media in prove condotte ad una pressione durante l'essiccamento primario pari a 60 mTorr e 90 mTorr. Temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario pari a 0°C.

### 3.3.3 Nucleazione controllata

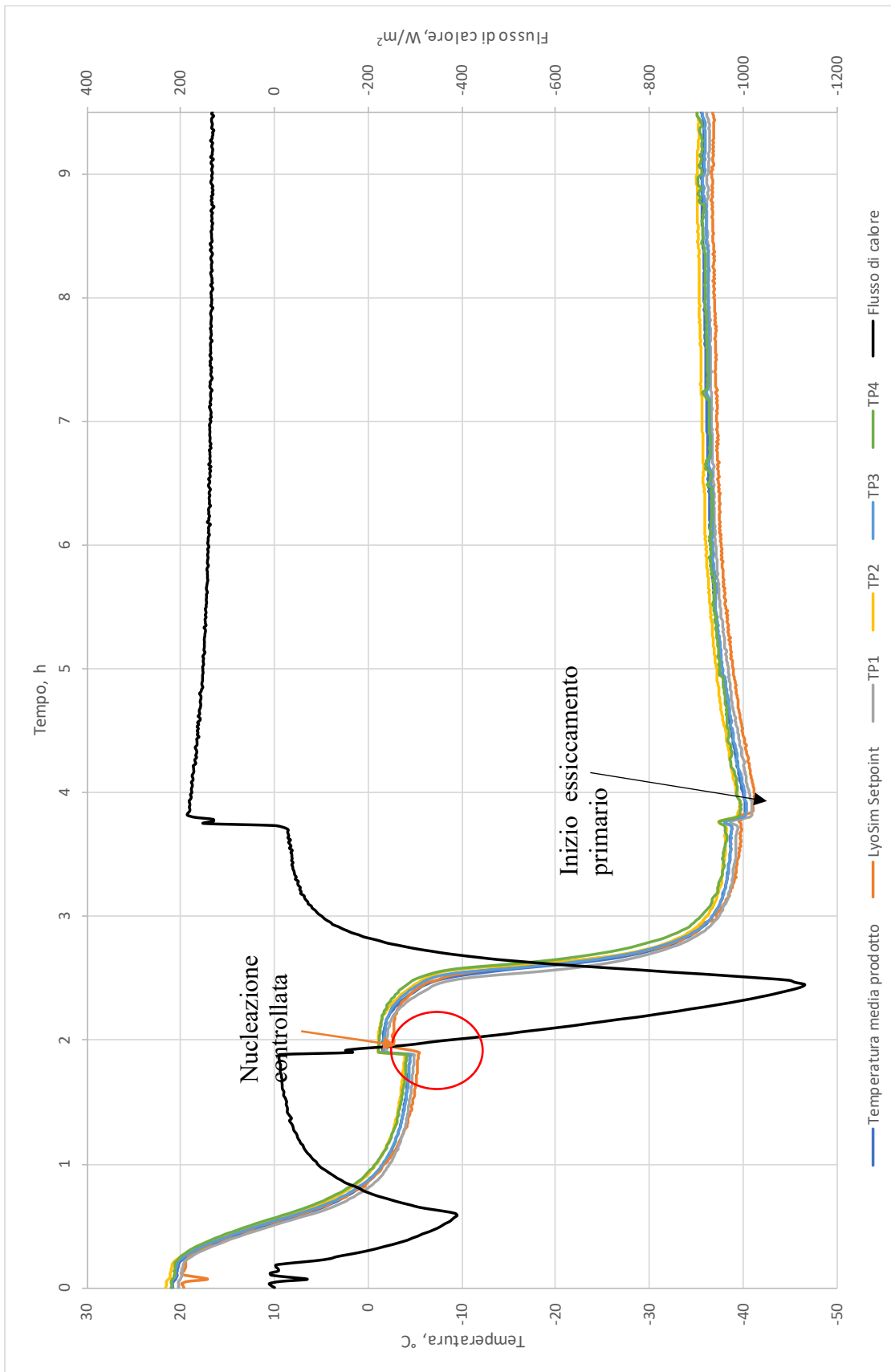
Il *MicroFD*® permette l'utilizzo del *FreezeBooster*®, come descritto nella sezione 2.1.4, il quale permette di ottenere una nucleazione controllata tramite l'utilizzo della "nebbia di ghiaccio". In Figura 3.16 si mostra la classica ricetta seguita per l'ottenimento della nucleazione controllata.



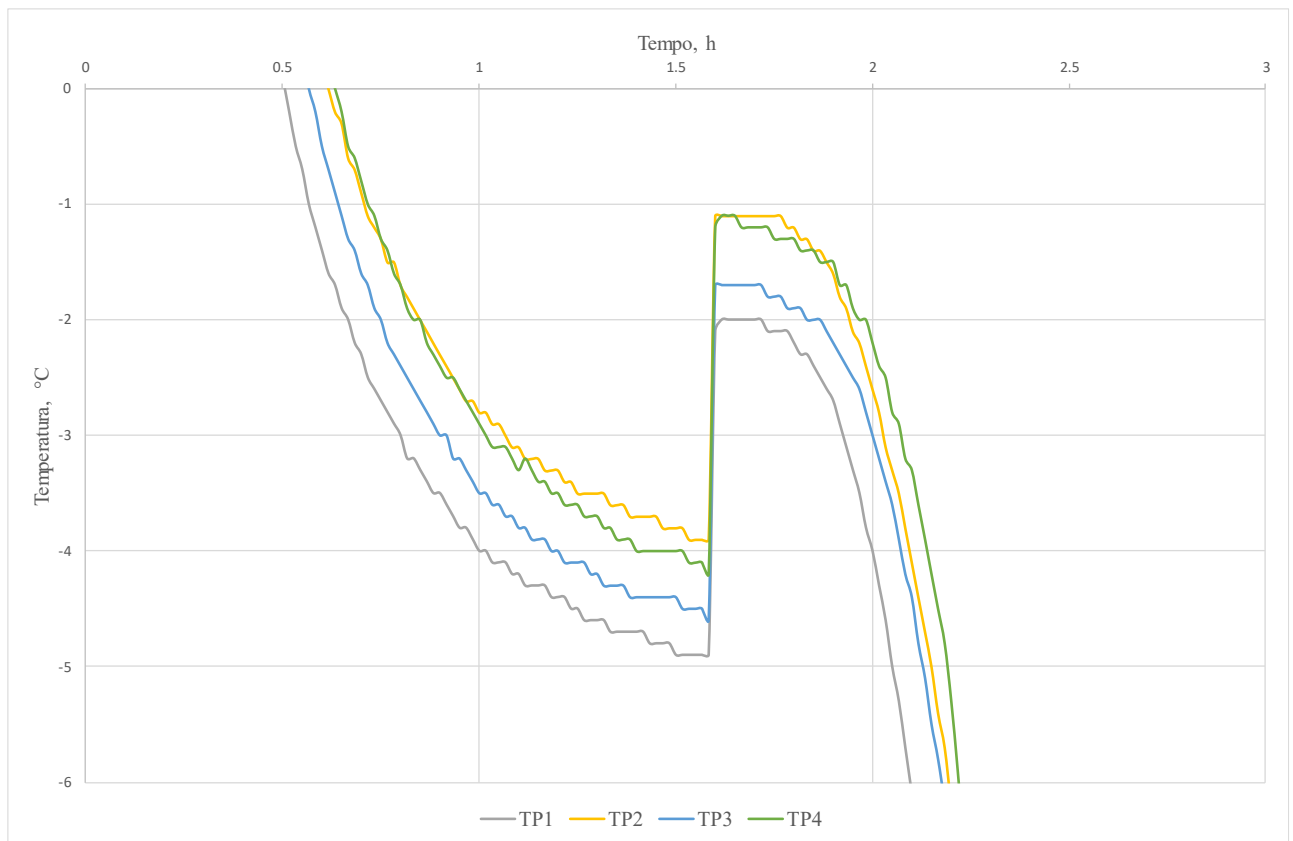
**Figura 3.16** Classica ricetta *Optimize*, in cui è possibile ottenere una nucleazione controllata.

In Figura 3.17 si mostra il grafico che rappresenta le temperature lette dalle termocoppie e il flusso di calore rilevato da *Accuflux*® per tutta la durata della ricetta (nel caso in esame è stata eseguita la ricetta rappresentata in Figura 3.16). In Figura 3.18 si mostra nel dettaglio l'andamento delle temperature lette dalle termocoppie al momento della nucleazione.



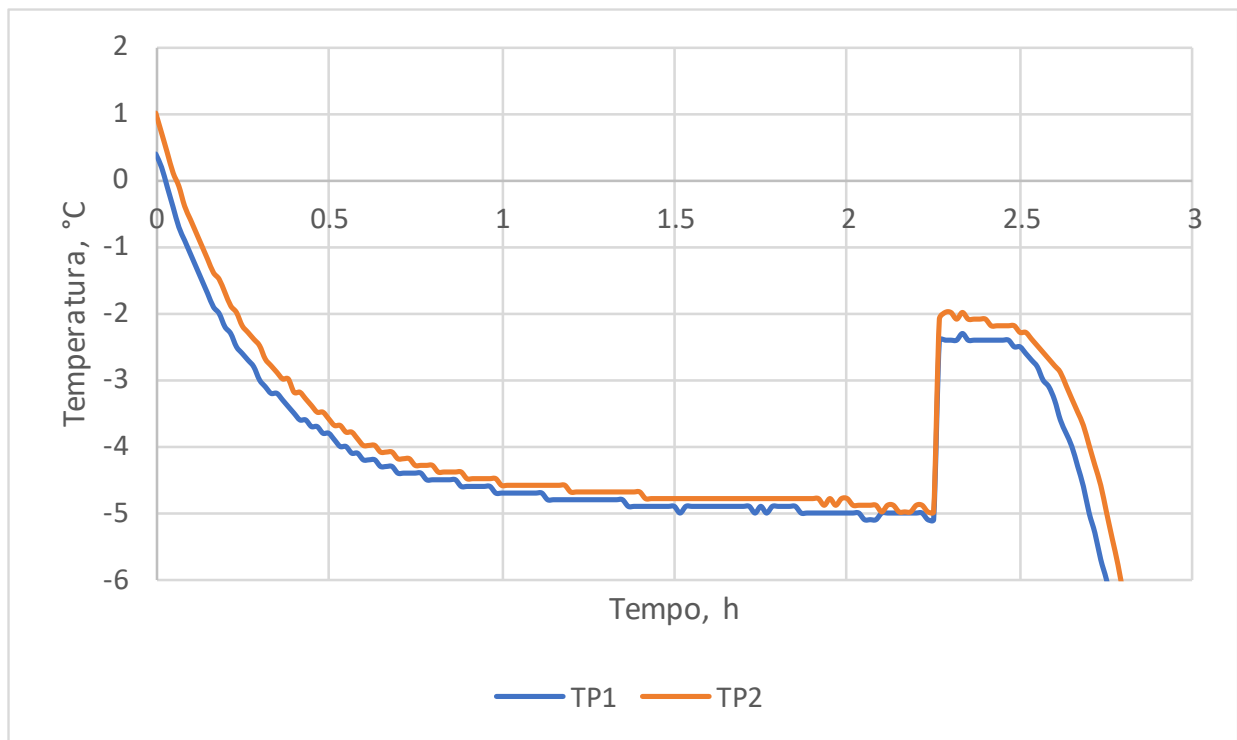


**Figura 3.17** Grafico che mostra l'andamento della temperatura media del prodotto e del flusso di calore rilevato da *Accuflux*® per una prova condotta con l'utilizzo di *FreezeBooster*® per l'ottenimento della nucleazione controllata.



**Figura 3.18** Dettaglio del fenomeno di nucleazione controllata tramite l'utilizzo di *FreezeBooster*®.

Da Figura 3.17 si osserva come gli andamenti di flusso di calore e temperature siano molto simili a quelli rappresentati in Figura 3.5, l'unica differenza è la fase di congelamento. Per ottenere maggiore omogeneità nelle temperature dei prodotti, si abbassa la temperatura del ripiano a  $-5^{\circ}\text{C}$  e la si mantiene per un tempo sufficientemente lungo. Tuttavia, si nota dal dettaglio in Figura 3.18 che le termocoppie segnalano una differenza di circa  $1^{\circ}\text{C}$  fra i flaconi poco prima che la nucleazione avvenga (differenza stimata fra la termocoppia TP2, posta al centro del ripiano, e la termocoppia TP1 posta fra la termocoppia TP2 e un flacone di bordo), e che neanche la termocoppia TP1, quella con la temperatura più bassa di tutte, raggiunge i  $-5^{\circ}\text{C}$ . La durata della permanenza del ripiano a  $-5^{\circ}\text{C}$ , in questo caso, era di 70 minuti. Con una durata di 150 minuti si ottiene, invece, il risultato mostrato in Figura 3.19.

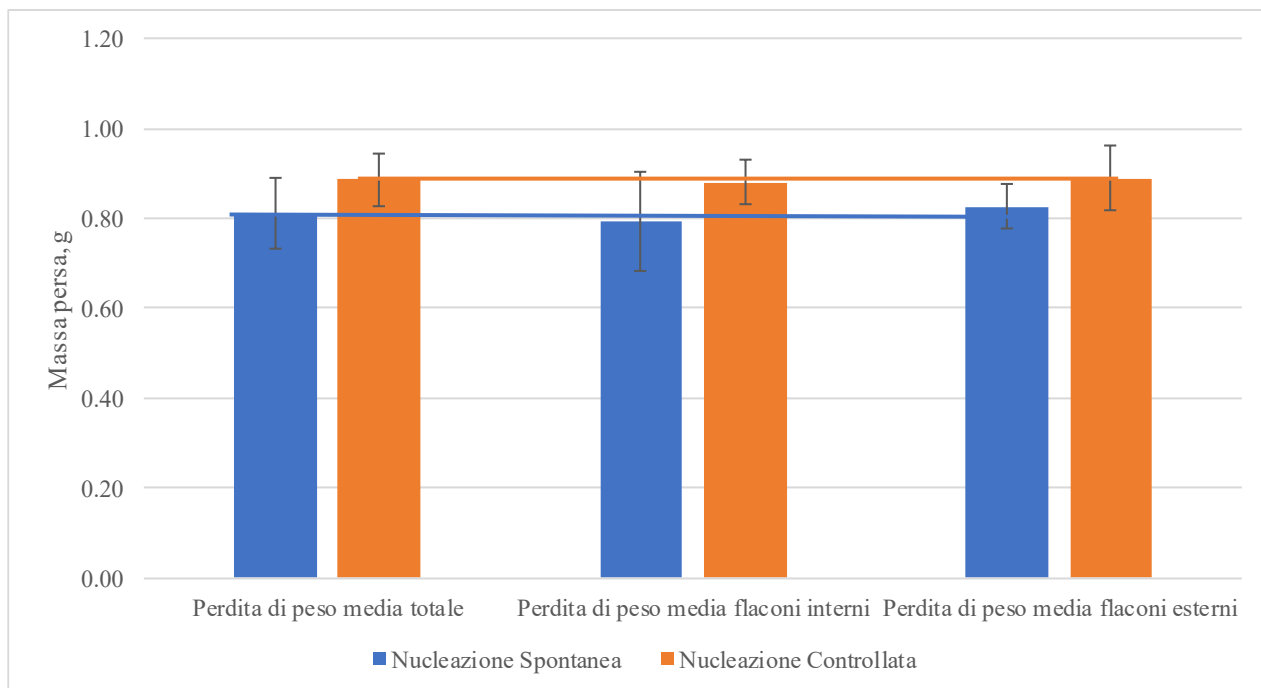


**Figura 3.19** Dettaglio del fenomeno di nucleazione controllata tramite l'utilizzo di *FreezeBooster*®. Permanenza del ripiano a -5°C pari a 150 minuti. Utilizzo di sole due termocoppie.

Dal grafico è chiaro che prolungando fino a 150 minuti la temperatura del ripiano a -5°C le termocoppie riescono a raggiungere la temperatura desiderata di nucleazione.

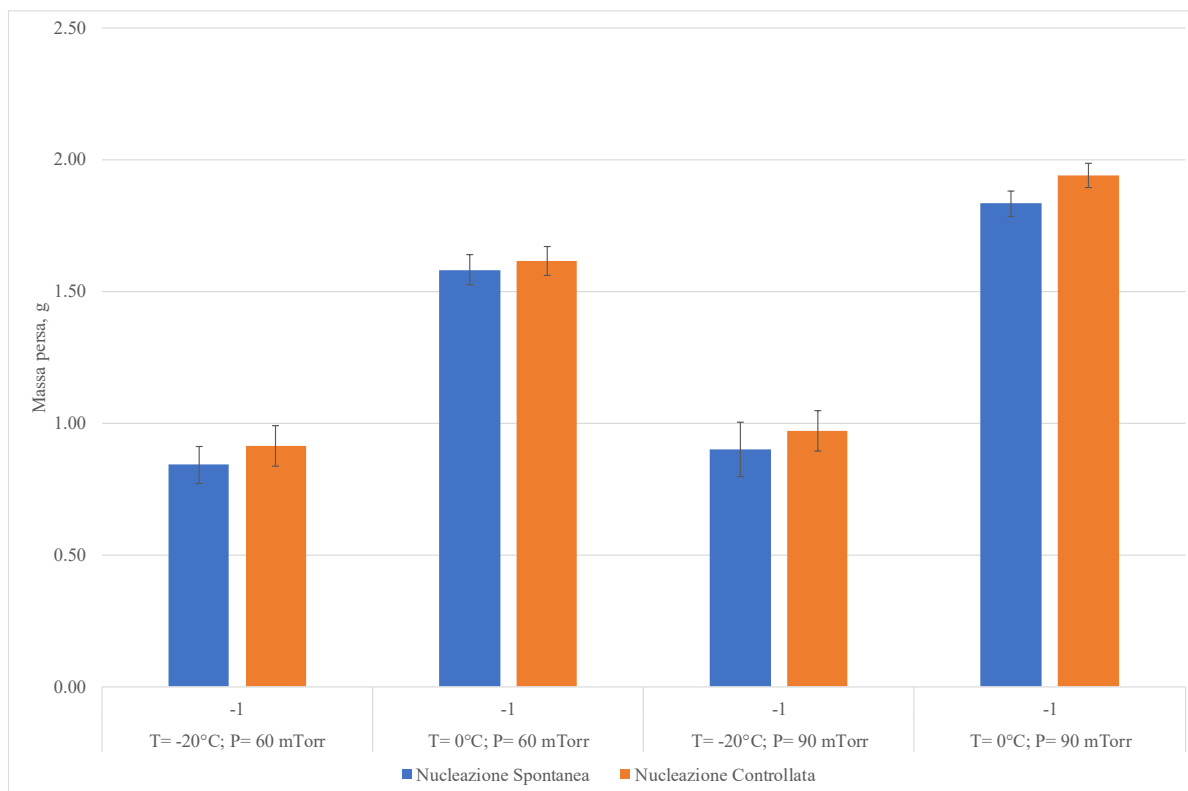
Con la nucleazione controllata ci si aspetta di avere una maggiore omogeneità all'interno del *batch*, in quanto la nucleazione del prodotto nei flaconi avviene al medesimo momento e all'incirca alla medesima temperatura. Questo porta ad avere una morfologia dei cristalli più simile all'interno dei vari flaconi e, quindi, un percorso più simile del prodotto durante l'essiccamento primario.

Per valutare l'effetto della nucleazione controllata si propongono i risultati di due prove identiche per parametri, eccetto che in una avviene nucleazione spontanea, nell'altra controllata. In Figura 3.20 si mostrano le perdite di peso medie che ricevono i flaconi dell'intero *batch*, i flaconi interni e quelli esterni.



**Figura 3.20** Confronto della perdita di peso media in prove condotte con nucleazione controllata e nucleazione spontanea.

Risulta evidente che in questa prova la differenza principale è la maggior perdita di peso che l'utilizzo della nucleazione controllata comporta. La deviazione standard, la percentuale di calore ricoperta dal calore derivante dal ripiano rispetto a quello totale per la sublimazione della massa persa (% $Q$ ) e l'andamento delle perdite di peso medie di flaconi interni o esterni non hanno un andamento costante al variare degli altri parametri quando si confrontano prove identiche con diversa tipologia di nucleazione. Solo la perdita di peso media dell'intero *batch* risulta sempre maggiore con la nucleazione controllata, come è possibile vedere in Figura 3.21.



**Figura 3.21** Confronto delle perdite di peso medie dell'intero *batch* ottenute in prove a diversa temperatura di ripiano (T) e pressione della camera (P) durante la fase di essiccamento primario e condotte con due metodologie differenti di nucleazione: spontanea e controllata. Temperatura dell'anello pari a  $-1^{\circ}\text{C}$  rispetto la temperatura media del prodotto rilevata dal prodotto.

Le prove analizzate sono state effettuate utilizzando diverse coppie di valori di temperatura di ripiano e pressione della camera durante l'essiccamento primario, ma l'andamento della perdita di peso è la medesima: in presenza di nucleazione controllata si ha una maggiore sublimazione del ghiaccio. Poiché le condizioni operative, per ogni coppia di prove, non variano, l'effetto è dovuto solo al ruolo che ricopre la nucleazione controllata nell'essiccamento primario, anche perché la temperatura del prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario non viene influenzata dalla tipologia di nucleazione avvenuta.

La nucleazione controllata permette di determinare il grado di sotto-raffreddamento delle soluzioni nel momento della nucleazione, influenzando la dimensione dei cristalli che si andranno a formare (come spiegato nella sezione 1.2.1). Con la nucleazione spontanea la temperatura a cui avviene la nucleazione varia, come mostrato in Figura 1.5, ed è inferiore a  $-5^{\circ}\text{C}$  (in alcuni flaconi essa avviene anche ad una temperatura inferiore ai  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Come risultato, durante la nucleazione spontanea si avrà la formazione di cristalli più piccoli in alcuni flaconi, i quali andranno a "rallentare" l'essiccamento primario, inducendo una resistenza maggiore al flusso di vapore originatosi in seguito alla sublimazione. Il rallentamento dell'essiccamento primario comporta che, a parità di durata e dei restanti parametri dello stesso, la perdita di massa sarà inferiore, come atteso.

La deviazione standard è solitamente più bassa con l'utilizzo della nucleazione controllata a cui corrisponde un maggior valore di  $\%Q$ , ma questo andamento non si mantiene in tutte le prove condotte. Il motivo di ciò può essere dovuto al fatto che la temperatura a cui avviene la nucleazione spontanea nel prodotto non è troppo distante da quella a cui viene fatta avvenire la nucleazione controllata e, comunque, sempre compresa in un range di circa  $5^{\circ}\text{C}$ . Anche  $1^{\circ}\text{C}$  di

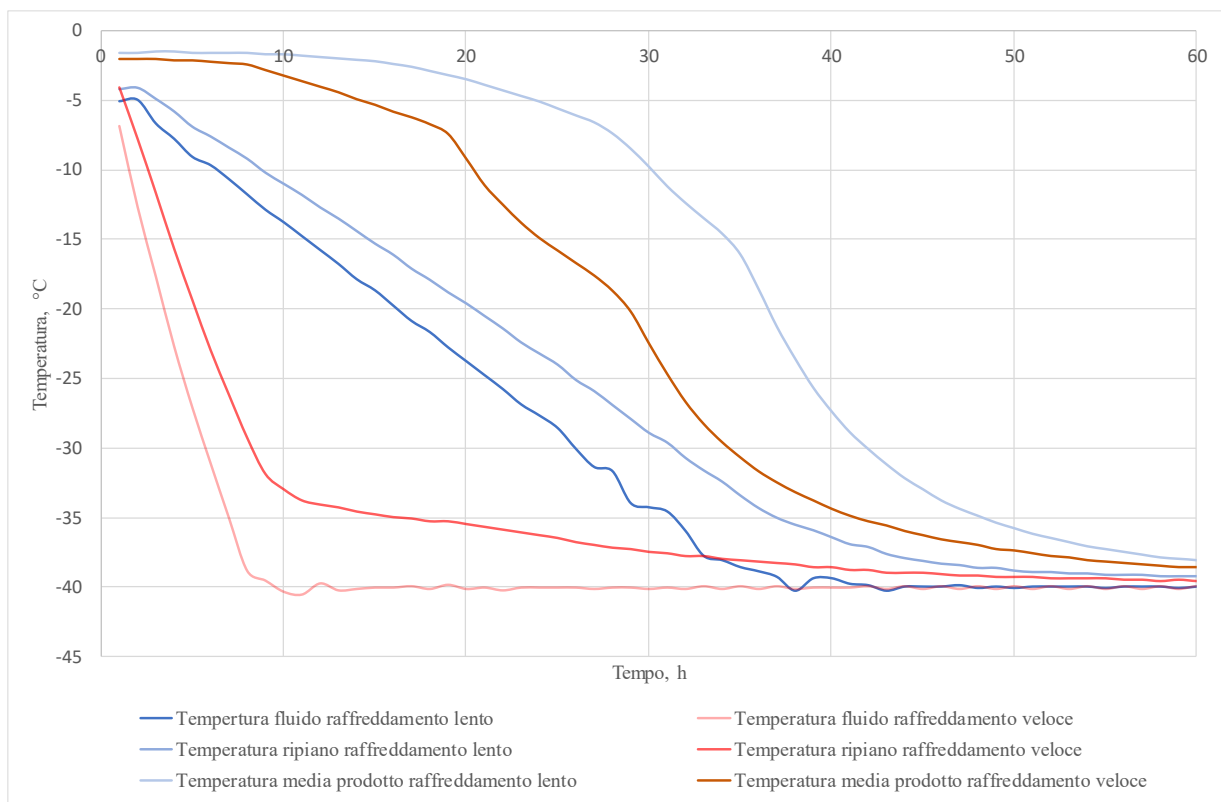
differenza nella nucleazione influenza il processo, ma per giovare maggiormente dell'effetto della nucleazione controllata bisognerebbe operare in ambienti sterili e privi di polveri, così che la nucleazione spontanea avvenga in un range di temperatura più ampio e a temperature più basse, e una nucleazione controllata anche a 5°C darebbe dei risultati nettamente differenti rispetto alla nucleazione spontanea.

#### 3.3.4 Effetto della velocità di raffreddamento

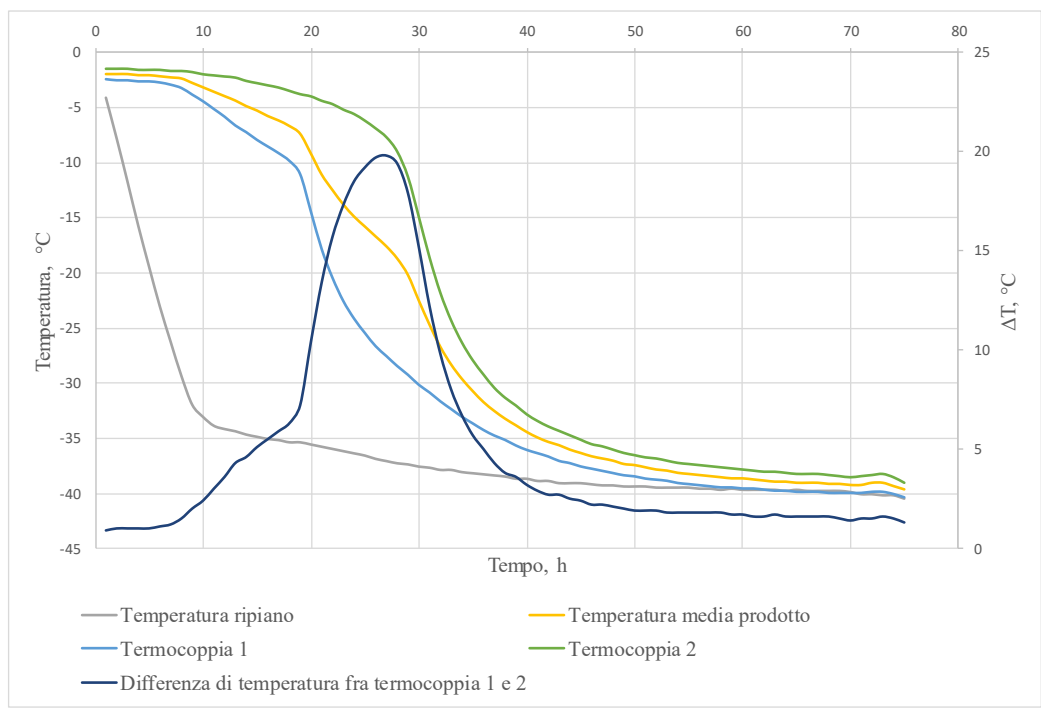
Un altro parametro da tenere in considerazione è la velocità di raffreddamento richiesta al liofilizzatore durante il processo di congelamento. Una velocità di raffreddamento elevata può portare ad elevate differenze di temperatura fra i prodotti, creando gradienti termici non indifferenti che avranno conseguenze importanti nei risultati. Questo è dovuto alla diversa formazione dei cristalli di ghiaccio, che avranno diverse dimensioni a seconda della velocità utilizzata per il raffreddamento del prodotto.

Per lo studio dell'effetto che ha sul processo si considerano due prove condotte con la nucleazione controllata. L'unica differenza presente fra le due prove in esame è la velocità di raffreddamento adottata per abbassare la temperatura del prodotto a -40°C in seguito alla nucleazione controllata per cui le due prove differiscono è quello che segue la nucleazione controllata. In una prova è stato richiesto al ripiano di raggiungere la temperatura di -40°C nel tempo più rapido possibile partendo dalla temperatura di nucleazione. Nella seconda prova la velocità di raffreddamento è stata impostata ad 1°C al minuto.

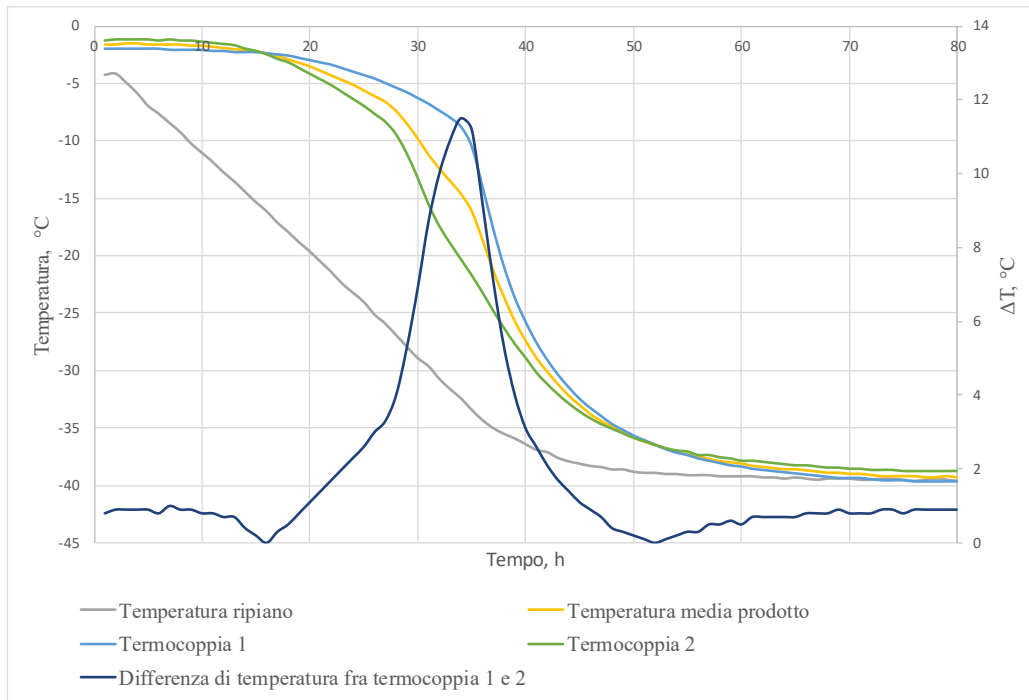
Nel grafico in Figura 3.22 è mostrato l'andamento della temperatura del prodotto, della temperatura del fluido e della temperatura del ripiano. L'aspetto più rilevante da tenere in considerazione è, però, la differenza di temperatura che si origina fra i flaconi monitorati dalle termocoppie. Nei grafici successivi mostrati in Figura 3.23 e Figura 3.24, si considerano separatamente le due velocità di raffreddamento e si analizza la differenza di temperatura che si origina fra le termocoppie durante la fase di congelamento successiva alla nucleazione.



**Figura 3.22** Andamento della temperatura del prodotto, del fluido di raffreddamento e del ripiano in condizioni di raffreddamento lento e raffreddamento veloce. Le curve colorate con gradazioni del rosso sono riferite al raffreddamento veloce del ripiano, mentre quelle colorate con gradazioni del blu sono riferite al raffreddamento lento del ripiano.



**Figura 3.23** Andamento della temperatura delle due termocoppie, della temperatura media del prodotto, del ripiano durante raffreddamento veloce del ripiano in fase di congelamento. E' mostrata, inoltre, la differenza di temperatura fra la termocoppia 1 e la termocoppia 2.



**Figura 3.24** Andamento della temperatura delle due termocoppie, della temperatura media del prodotto, del ripiano durante raffreddamento lento del ripiano in fase di congelamento. È mostrata, inoltre, la differenza di temperatura fra la termocoppia 1 e la termocoppia 2.

In questi due grafici sono stati inseriti anche gli andamenti relativi delle temperature lette dalle termocoppie, insieme ad una curva determinata dalla differenza di temperatura delle due termocoppie, da cui è evidente come nel raffreddamento veloce la differenza di temperatura fra le due termocoppie risulta sempre maggiore rispetto a quella nel raffreddamento lento. Inoltre, nel raffreddamento veloce, tale differenza di temperatura raggiunge un picco di 20°C, mentre nel raffreddamento lento il picco è di circa la metà (11,5°C). Adottare un raffreddamento veloce, pertanto, comporta una maggior eterogeneità nel *batch* durante il ciclo e al suo termine.

In Tabella 3.3 sono mostrati i risultati delle prove differenti solo per la velocità di raffreddamento.

**Tabella 3.3** Risultati ottenuti in una prova condotta con nucleazione controllata con due diverse velocità di raffreddamento durante la fase di congelamento.

Prova	T <i>LyoSim</i> <sup>®</sup> (°C)	Perdita di peso media, g	Dv.STD, %	Velocità raffreddamento
1	-1	0.93	10%	Veloce
2	-3	0.90	9%	Veloce
3	-5	0.86	10%	Veloce
4	-1	0.91	8%	Lenta
5	-3	0.89	6%	Lenta
6	-5	0.90	5%	Lenta



La perdita di peso risultante al termine del ciclo è simile in tutte e sei le prove, ma è la distribuzione di questa che migliora nettamente rallentando il processo di raffreddamento.

### 3.4 Analisi statistica

Per l'applicazione del modello è necessario determinare le due matrici **X** e **Y**, mostrate rispettivamente in Tabella 3.4 e in Tabella 3.5.

**Tabella 3.4** Matrice **X**.

Osservazione	Temperatura ripiano (°C)	Pressione camera (mTorr)	Temperatura anello (°C)	Termocoppie	Nucleazione
1	-20	60	-1	sparse	Spontanea
2	-20	60	-3	sparse	Spontanea
3	-20	60	-5	sparse	Spontanea
4	-20	90	-1	sparse	Spontanea
5	-20	90	-3	sparse	Spontanea
6	-20	90	-5	sparse	Spontanea
7	-20	60	-1	centrali(5)	Spontanea
8	-20	60	-3	centrali(5)	Spontanea
9	-20	60	-5	centrali(5)	Spontanea
10	-20	60	-1	centrali(2)	Spontanea
11	-20	60	-3	centrali(2)	Spontanea
12	-20	60	-5	centrali(2)	Spontanea
13	0	60	-1	centrali(2)	Spontanea
14	0	60	-3	centrali(2)	Spontanea
15	0	60	-5	centrali(2)	Spontanea
16	-20	90	-1	centrali(2)	Spontanea
17	-20	90	-3	centrali(2)	Spontanea
18	-20	90	-5	centrali(2)	Spontanea
19	0	90	-1	centrali(2)	Spontanea
20	0	90	-3	centrali(2)	Spontanea
21	0	90	-5	centrali(2)	Spontanea
22	-20	60	-1	centrali(2)	Controllata
23	-20	60	-3	centrali(2)	Controllata
24	-20	60	-5	centrali(2)	Controllata
25	0	60	-1	centrali(2)	Controllata
26	0	60	-3	centrali(2)	Controllata
27	0	60	-5	centrali(2)	Controllata
28	-20	90	-1	centrali(2)	Controllata
29	-20	90	-3	centrali(2)	Controllata
30	-20	90	-5	centrali(2)	Controllata
31	0	90	-1	centrali(2)	Controllata
32	0	90	-3	centrali(2)	Controllata
33	0	90	-5	centrali(2)	Controllata

**Tabella 3.5** Matrice Y. Con  $T_{p,avg}$  si intende la temperatura del prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario. Dv.STD sta per deviazione standard. I pedici *i*, *e* e *tot* stanno ad indicare, rispettivamente, flaconi interni, flaconi esterni e flaconi dell'intero *batch*.

Oss	$T_{p,avg}$ (°C)	%Q (%)	$\Delta m_{tot}$ (g)	Dv.STD <sub>tot</sub> (%)	$\Delta m_i$ (g)	Dv.STD <sub>i</sub> (%)	$\Delta m_e$ (g)	Dv.STD <sub>e</sub> (%)	$\Delta m_e - \Delta m_i$ (g)
1	-35.8	36	0.86	6.30	0.82	5.01	0.88	5.39	0.06
2	-36.1	47	0.85	14.16	0.78	6.97	0.88	15.04	0.10
3	-36.1	38	0.76	9.83	0.77	11.78	0.74	8.64	-0.03
4	-35.2	44	0.93	15.69	0.83	7.89	0.99	15.35	0.15
5	-35.0	65	1.02	16.95	1.07	17.46	0.99	16.67	-0.08
6	-34.4	51	0.92	17.37	0.93	16.78	0.91	18.39	-0.03
7	-36.0	43	0.84	7.70	0.81	7.57	0.86	7.00	0.05
8	-35.9	43	0.81	7.20	0.79	7.34	0.83	6.66	0.04
9	-36.1	41	0.81	5.23	0.80	5.49	0.82	5.76	0.02
10	-35.4	33	0.84	6.95	0.83	8.28	0.85	5.74	0.03
11	-35.2	32	0.81	7.88	0.79	11.14	0.83	4.86	0.03
12	-35.0	58	0.79	6.88	0.78	7.27	0.79	6.93	0.01
13	-33.8	60	1.58	5.55	1.55	6.24	1.60	5.08	0.05
14	-32.5	49	1.59	4.42	1.56	4.12	1.60	4.49	0.04
15	-33.4	55	1.55	3.57	1.58	2.86	1.53	3.43	-0.05
16	-35.1	49	0.83	11.10	0.81	9.86	0.85	11.71	0.04
17	-34.9	52	0.85	5.99	0.83	4.75	0.87	6.22	0.04
18	-35.2	47	0.86	6.59	0.88	6.67	0.85	6.57	-0.03
19	-32.1	49	1.83	4.81	1.76	2.92	1.87	4.31	0.11
20	-32.6	52	1.70	6.04	1.73	4.77	1.69	6.77	-0.04
21	-32.9	51	1.88	3.62	1.89	3.87	1.88	3.60	-0.02
22	-35.5	47	0.91	7.65	0.86	6.51	0.94	6.96	0.08
23	-35.6	38	0.89	6.02	0.88	4.96	0.89	7.14	0.01
24	-35.6	41	0.89	8.44	0.85	8.71	0.91	7.68	0.05
25	-34.3	45	1.61	5.37	1.58	7.16	1.65	3.85	0.06
26	-33.9	46	1.61	5.06	1.56	6.15	1.62	2.58	0.06
27	-34.3	58	1.52	5.00	1.50	5.07	1.53	3.64	0.04
28	-35.45	54	0.97	7.64	0.93	6.19	1.00	7.21	0.07
29	-34.8	46	0.93	11.98	0.90	11.32	0.95	12.46	0.04
30	-35.2	60	0.92	5.55	0.92	5.30	0.93	5.89	0.01
31	-34.4	55	1.94	4.54	1.94	5.44	1.94	4.18	0.00
32	-34.5	40	1.72	6.84	1.78	6.28	1.70	6.85	-0.08
33	-33.1	55	1.57	5.30	1.61	5.75	1.54	4.61	-0.06

Da queste matrici l'algoritmo restituisce inizialmente i valori di  $Q^2$ , relativi alla bontà di predizione del modello, riportati in Tabella 3.6.

**Tabella 3.6** Valori di  $Q^2$ .

Componente Principale	1	2	3	4	5	6
$Q^2$	0.308	0.418	0.508	0.539	0.570	0.556

Questo ci indica anche che il massimo numero di componenti principali è 5, in quanto la sesta componente principale presenta un valore di  $Q^2$  inferiore alla quinta. La capacità di predizione del modello non è molto elevata, ma data la quantità limitata di osservazioni, e l'elevato numero di variabili  $y$  considerate, un valore di bontà di predizione di circa il 57% può essere giustificabile.

In Tabella 3.7 sono riportati i valori di  $R_x^2$  e  $R_y^2$  per le 5 componenti principali.

**Tabella 3.7** Valori di  $R_x^2$  e  $R_y^2$ .

Componente Principale	1	2	3	4	5
$R_x^2$	0.347	0.505	0.676	0.797	0.900
$R_y^2$	0.386	0.539	0.625	0.671	0.697

Dalla tabella precedente è si osserva come la variabilità in  $\mathbf{Y}$  cambi sempre meno dalla seconda componente principale in poi, mentre quella in  $\mathbf{X}$  arriva al 90% con la quinta componente principale.

In Figura 3.25 viene mostrato il grafico della relazione interna  $t$  vs  $u$  (deve risultare  $\mathbf{T}=\mathbf{U}+\text{rumore}$ ).

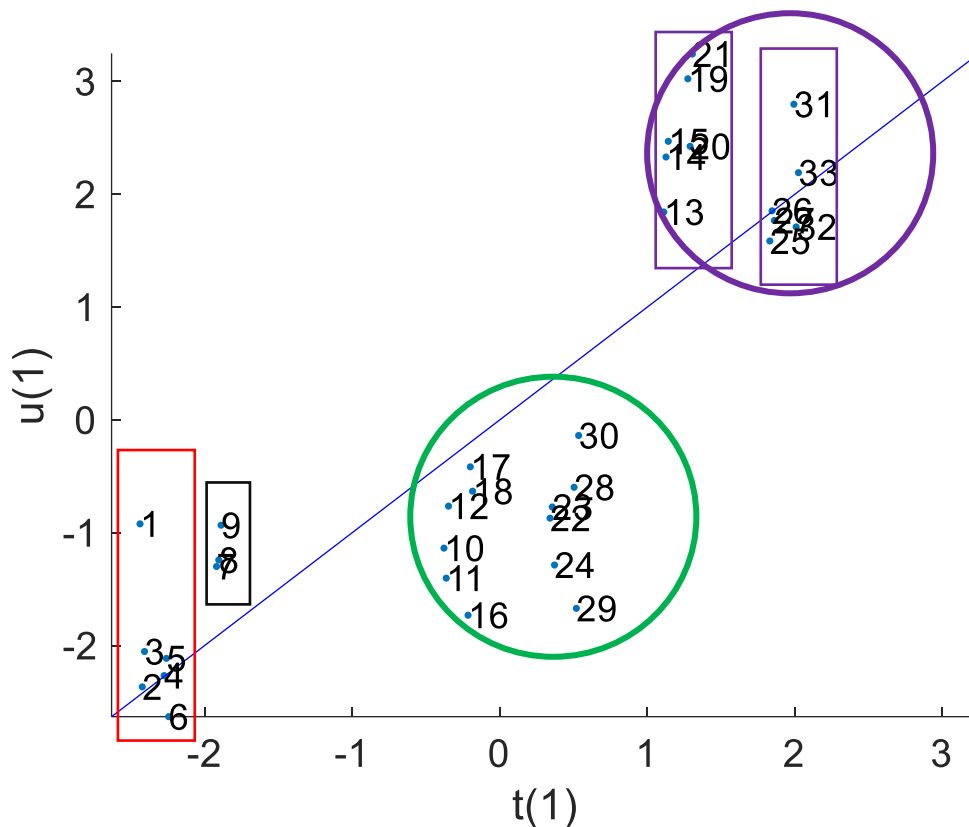
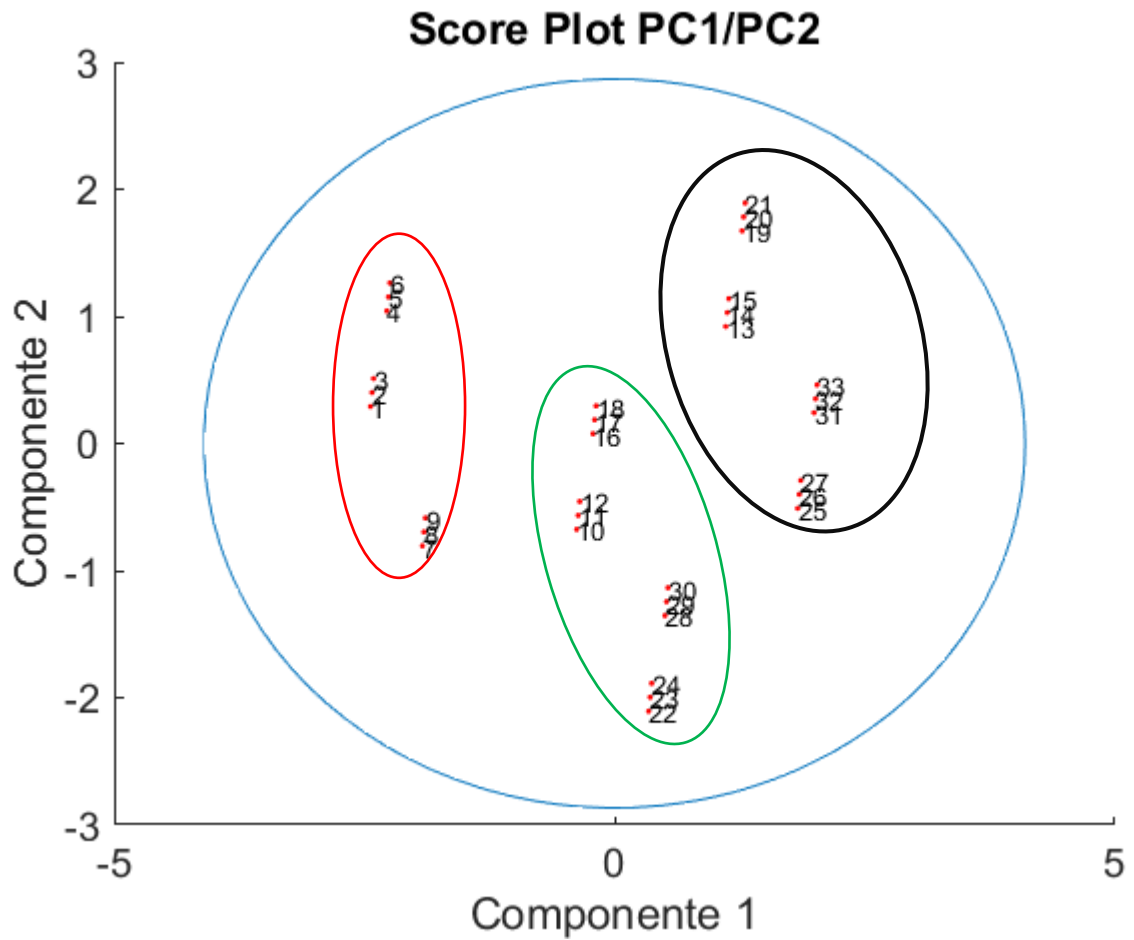


Figura 3.25 Grafico  $t$  vs  $u$  per la prima componente principale.

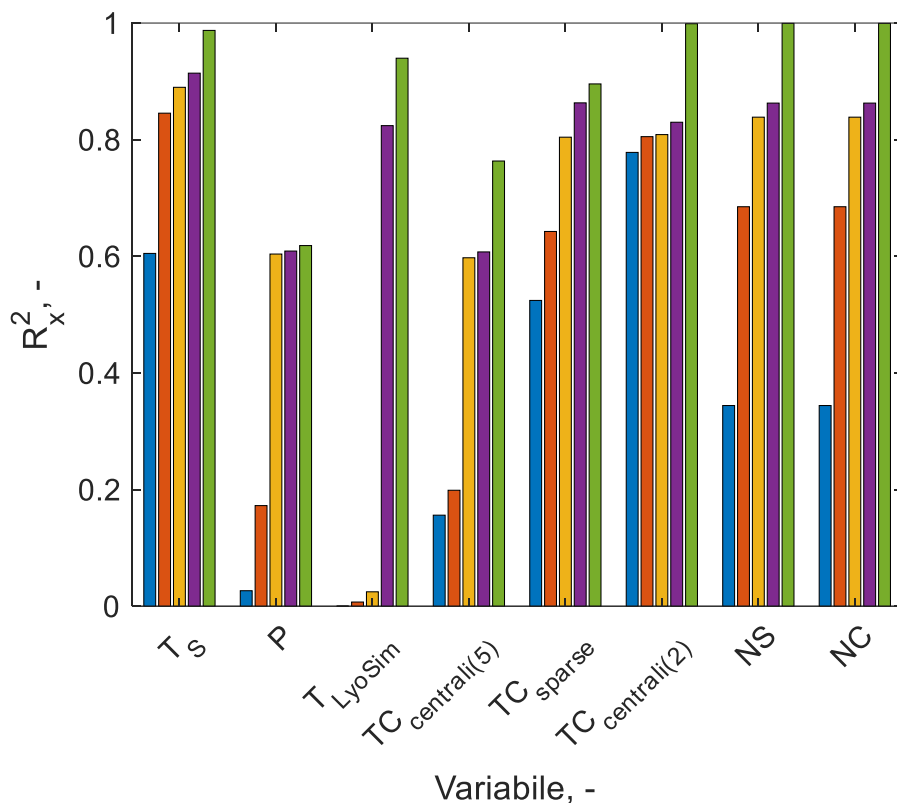
Il grafico precedente mette in evidenza dei *cluster*, cioè dei gruppi di osservazioni separate fra loro. La presenza di *cluster* così evidenti influenza la non corretta linearizzazione del modello. I tre *cluster* si distinguono per loro in base a due parametri fondamentali: disposizione delle termocoppie, in quanto il rettangolo rosso racchiude le prove condotte con cinque termocoppie disposte in ordine sparso e il rettangolo nero quelle condotte con cinque termocoppie centrali, e temperatura del ripiano, dove il cerchio verde racchiude le prove condotte a temperatura del ripiano pari a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mentre quello viola le prove condotte a temperatura del ripiano pari a  $0^{\circ}\text{C}$ .

Osservando con più attenzione i cerchi verde e viola si osserva una suddivisione in colonna delle osservazioni all'interno di ciascun cerchio (evidenziata con i due rettangoli in giallo a destra come esempio). La suddivisione è dovuta al tipo di nucleazione condotto durante la fase di congelamento, se spontanea o controllata. Questi *cluster* si ripropongono anche nello *score plot* delle componenti principali 1 e 2, mostrato in Figura 3.26.



**Figura 3.26** Score Plot componente principale 1 e 2.

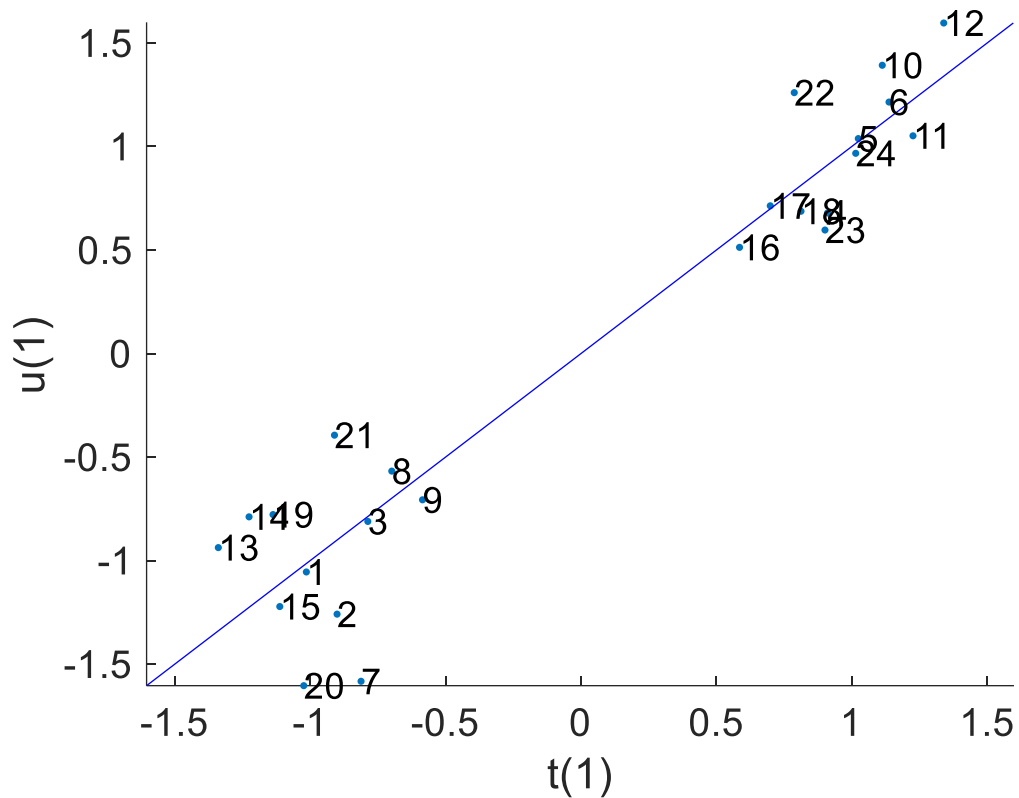
A causa della presenza di questi *cluster*, dovuti a disposizione delle termocoppie e temperatura del ripiano, si potrebbe avere il mascheramento degli altri parametri. Per valutare ciò si osservano i contributi di ciascuna variabile  $x$  nelle varie componenti principali in termini di variabilità in Figura 3.27 che mostra  $R_x^2$ .



**Figura 3.27** Grafico a barre di  $R_x^2$ . TC è l'abbreviazione per termocoppie. NS e NC sono le abbreviazioni per Nucleazione Spontanea e Nucleazione Controllata. Le barre sono colorate in base alla componente principale a cui si riferiscono: blu (1), rosso (2), giallo (3), viola (4), verde (5).

Da Figura 3.27 risulta che la componente principale 1, che descrive il 30% del 56% della bontà di predizione del modello (valori ricavabili da Tabella 3.6) è descritta nella sua totalità dalla disposizione delle termocoppie, dalla temperatura del ripiano e, con contributo inferiore, dalla tipologia di nucleazione. Il problema principale è che la pressione e la temperatura dell'anello non contribuiscono al modello se non dalla componente principale 3 (per la pressione) e 4 (per la temperatura dell'anello), non essendo, tuttavia, mai predominanti fra le altre variabili. Questi risultati potrebbero indicare che l'inclusione della disposizione delle termocoppie all'interno del *batch* potrebbe portare al mascheramento delle altre variabili, portando all'ottenimento di un modello non corretto.

Rimuovendo, pertanto, dalle matrici **X** e **Y** le osservazioni dalla 1 alla 9, si rimuove una variabile dal modello, relativa alla disposizione delle termocoppie. Questo potrebbe condurre ad una miglior linearità della relazione interna. Eseguendo nuovamente l'algoritmo la relazione lineare risultante è mostrata in Figura 3.28, da cui è possibile notare che, nonostante la persistente presenza di *cluster* all'interno del modello dovuta alla temperatura del ripiano (a sinistra abbiamo le prove condotte a -20°C a destra quelle condotte a 0°C) si perde la presenza della separazione in bande verticali delle prove condotte a nucleazione controllata e a nucleazione spontanea. Questo potrebbe suggerire che l'effetto di tale variabile era disturbato dalla presenza della disposizione delle termocoppie, probabilmente dovuto al fatto che entrambe siano variabili categoriche, quindi descritte unicamente con una serie di 1 e 0, e verosimilmente intercorrelate tra di loro.



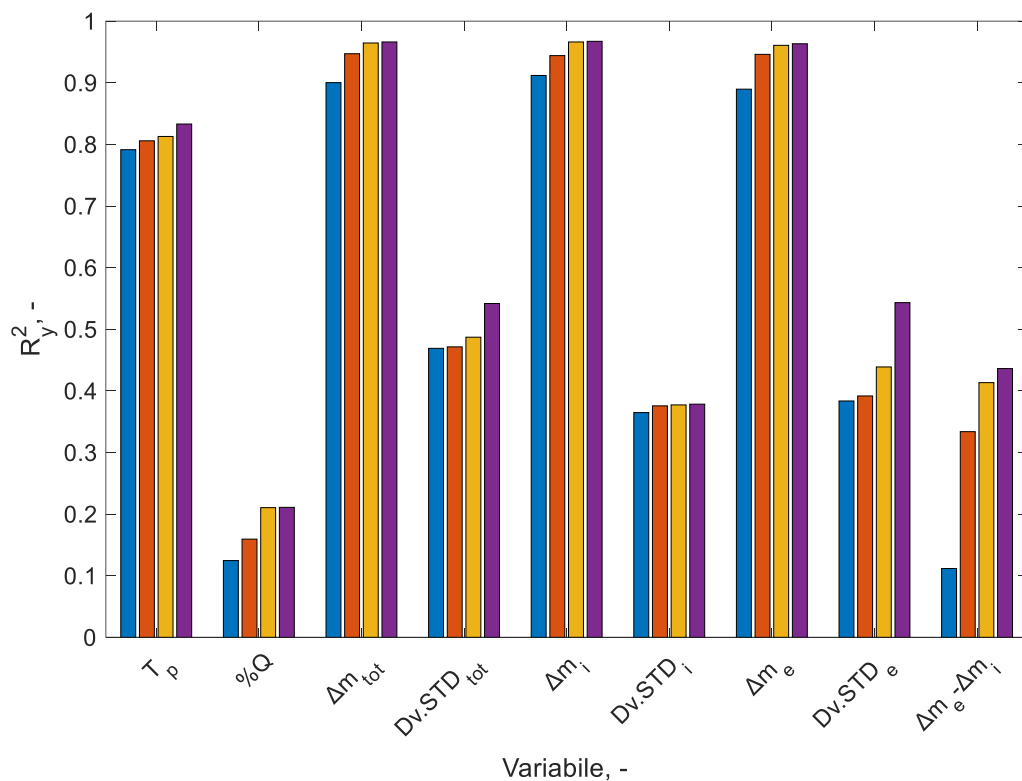
**Figura 3.28** Grafico  $t$  vs  $u$  per la prima componente principale.

Il valore di  $Q^2$  ottenuto è mostrato in Tabella 3.8 e si nota come questo in realtà diminuisca rispetto al caso precedente, indicando una modellazione peggiore.

**Tabella 3.8** Valori di  $Q^2$ .

Componente Principale	1	2	3	4	5	6
$Q^2$	0.308	0.418	0.508	0.539	0.570	0.556

La causa di tale risultato può essere ricercata in Figura 3.29, la quale contiene la variabilità delle variabili  $y$  presenti nel modello.



**Figura 3.29** Grafico a barre di  $R_y^2$ . I pedici *tot*, *i* ed *e* stanno per totale, interna ed esterna rispettivamente.

Da Figura 3.29 risulta che il calore derivante dal ripiano rispetto a quello totale ricevuto dai flaconi necessario alla sublimazione dell'acqua,  $\%Q$ , e l'omogeneità del *batch*, intesa come differenza di perdita di peso media fra flaconi esterni ed interni, non sono affatto descritte dal modello.

Questo può indicare che nel nostro *dataset* queste due variabili non abbiano un andamento regolare o di cui è possibile predirne il comportamento. Pertanto potrebbero essere semplicemente rumore, e, sebbene descritte parzialmente dalle variabili *x* in gioco, il modello non riesce a modellarle. Si rimuovono, pertanto, anche queste due variabili *y* dal modello.

Il primo risultato fondamentale che si osserva è il valore di  $Q^2$  mostrato in Tabella 3.9 che risulta essere, fin dalla prima componente principale, maggiore dei valori di  $Q^2$  mostrati precedentemente in Tabella 3.6.

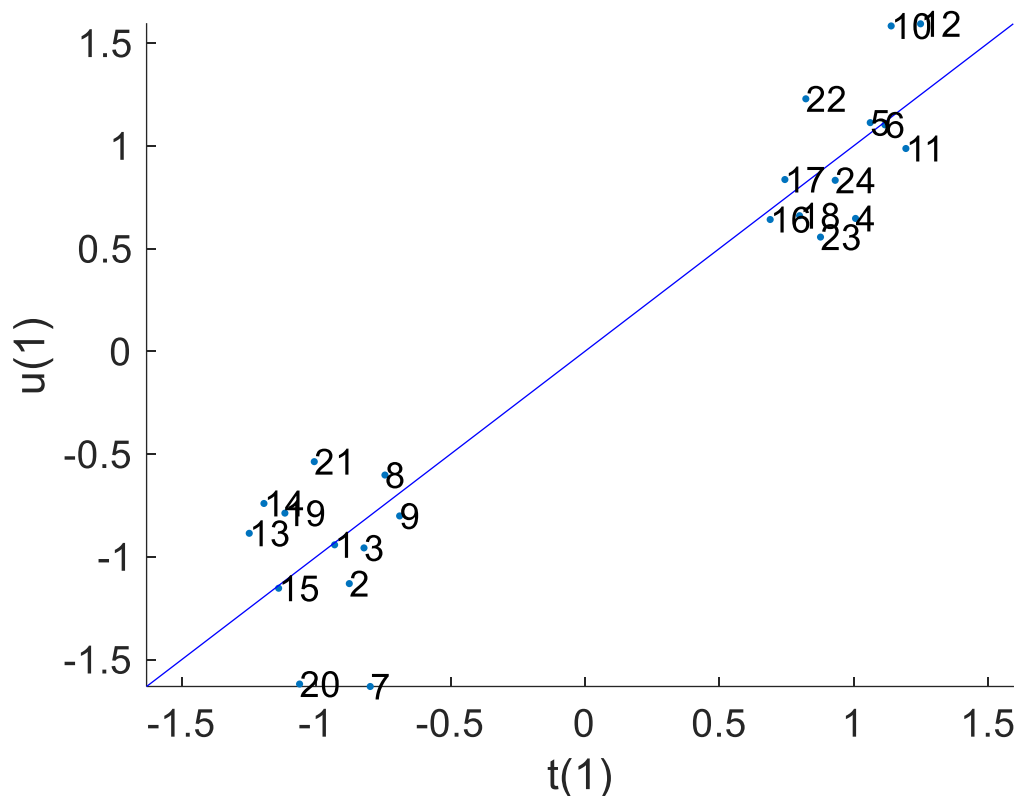
Questo giustifica maggiormente la rimozione nel modello delle due variabili *y*, che in qualche modo inducevano rumore all'interno del modello.

**Tabella 3.9** Valori di  $Q^2$ .

Componente Principale	1	2	3	4
$Q^2$	0.588	0.605	0.637	0.636

Dai valori di  $Q^2$  è possibile notare come la 4 componente principale non sia da considerare, riducendo la bontà di predizione del modello. Si continua l'analisi con sole 3 componenti. Si mostra in Figura 3.30 il grafico della relazione lineare della prima componente principale.





**Figura 3.30** Grafico  $t$  vs  $u$  per la prima componente principale.

Nonostante la rimozione delle prove condotte con diversa disposizione delle termocoppie e delle due variabili  $y$ , anche in questo caso si formano i due *cluster* per le due temperature di ripiano differenti. Questo può essere dovuto alla scarsa quantità di osservazioni disponibili per la modellazione. Tutte le prove condotte si differenziavano per soli due valori di temperatura (0 e -20°C) e pressione (60 e 90 mTorr), cosa che rende difficile una modellazione che non sia affetta da errori, data anche l'assenza di ripetizione di prove. Nonostante ciò, per i valori di  $Q^2$  ottenuti si possono ritenere soddisfacente per questo lavoro di Tesi i risultati mostrati in seguito.

Vengono mostrati in Tabella 3.10 i valori di  $R_x^2$  e  $R_y^2$

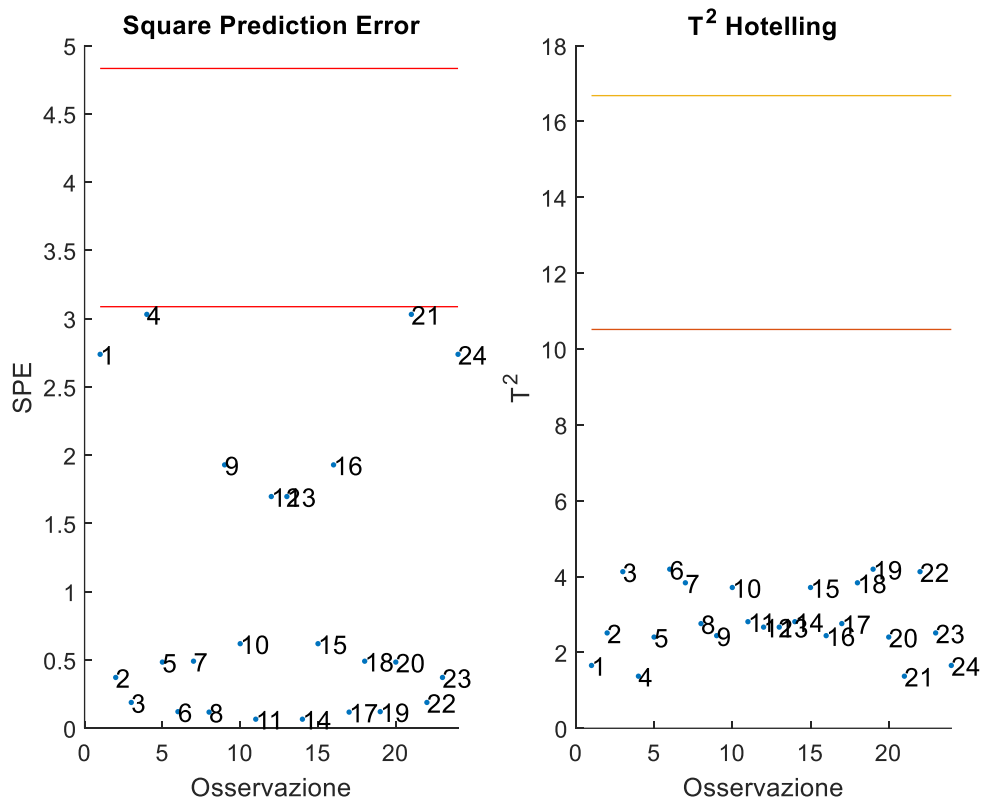
**Tabella 3.10** Valori di  $R_x^2$  e  $R_y^2$ .

Componente Principale	1	2	3
$R_x^2$	0.205	0.559	0.794
$R_y^2$	0.676	0.707	0.737

I valori di  $R_x^2$  e  $R_y^2$  sono maggiori di quelli mostrati in Tabella 3.7. Si nota come con meno componenti principali si ottengano risultati nettamente migliori, indice che le variabili precedentemente considerate comportavano solo rumore nella modellazione.

Prima di analizzare in maggior dettaglio quello che il modello spiega, è necessario validarlo. I grafici in Figura 3.31, che presentano lo *Square Prediction Error*,  $SPE$ , e il  $T^2$  di Hotelling. Ciò

che risulta è che tutte le osservazioni si trovino al di sotto dei corrispettivi limiti e la validazione del modello è confermata.



**Figura 3.31** SPE e  $T^2$  di Hotelling per il modello.

I risultati del grafico precedente si ripropongono anche nei grafici relativi alle coppie di componenti principali mostrati in Figura 3.32 e Figura 3.33, dove tutte le osservazioni si trovano all'interno del cerchio di predizione. Ogni grafico è costruito accoppiando la componente principale 1 con le restanti due. Ciò che si ripresenta è la dipendenza netta della componente principale 1 dalla temperatura del ripiano. Entrambi i grafici risultanti sono divisi in due serie verticali costituiti da osservazioni condotte a  $-20^{\circ}\text{C}$ , cerchi rossi, e da osservazioni condotte a  $0^{\circ}\text{C}$ , cerchi verdi. La non perfetta verticalità delle due serie di osservazioni suggerisce che nella composizione della componente principale 1 ci sia l'effetto di altre variabili. I due grafici sono comunque distinti in quanto le componenti 2 e 3 sono principalmente dipendenti da differenti variabili. In Figura 3.32 il grafico potrebbe essere suddiviso in due parti (suddivisione data dalla retta nera), mostrando che le prove che si trovano al di sopra della retta sono condotte con nucleazione spontanea, mentre quelle al di sotto sono condotte con nucleazione controllata. Questo indica che la componente principale 2 sia principalmente dipendente dal tipo di nucleazione.

Analogamente, il grafico in Figura 3.33 suddivide le prove condotte a 60 mTorr (sotto la retta nera) e quelle condotte a 90 mTorr (sopra la retta nera), che suggerisce la stretta dipendenza della componente principale 3 dalla pressione in camera.

La temperatura dell'anello è una variabile sempre presente in tutte e tre le componenti principali. Questo si può ricavare dal fatto che le osservazioni differenti solo per la temperatura dell'anello adottata rispetto la temperatura media del prodotto siano sempre distinguibili e non siano sovrapposte.

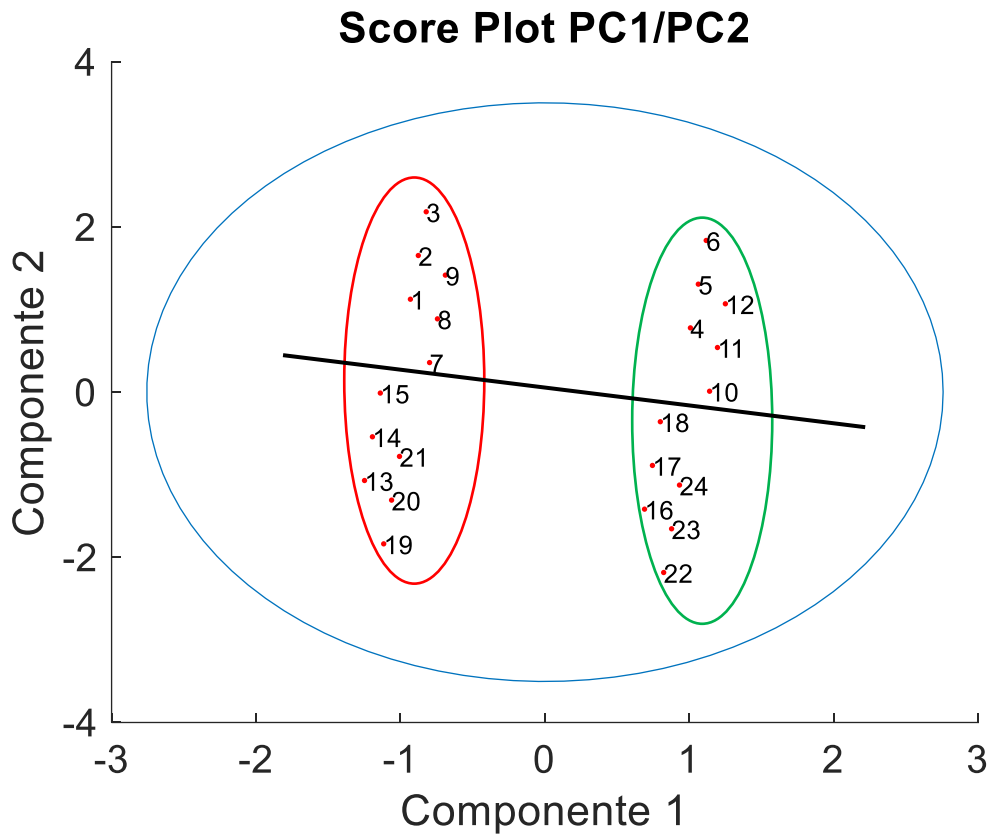


Figura 3.32 Grafico delle componenti principali 1 e 2

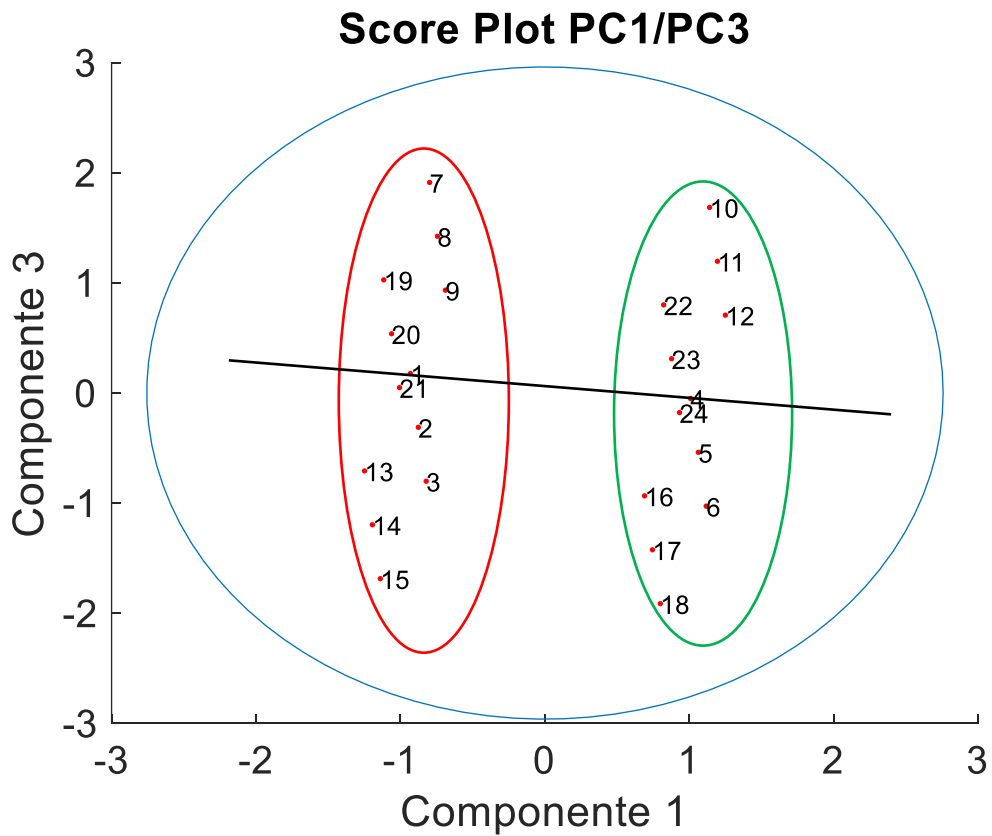


Figura 3.33 Grafico delle componenti principali 1 e 3

Per maggiore conferma di quello interpretabile graficamente si mostrano, in Tabella 3.11 e Tabella 3.12, i pesi  $w^*$  e  $c$  che le variabili, rispettivamente  $x$  e  $y$ , hanno sulle componenti principali.

**Tabella 3.11** Pesì  $w^*$  delle singole variabili  $x$  sulle varie componenti principali.

Componente Principale	1	2	3
Temperatura ripiano (°C)	0.99	-0.18	-0.12
Pressione camera (mTorr)	0.07	-0.39	0.89
Temperatura anello (°C)	-0.05	-0.44	0.41
Nucleazione Spontanea	0.08	0.56	0.23
Nucleazione Controllata	-0.08	-0.56	-0.23

**Tabella 3.12** Pesì  $c$  delle singole variabili  $y$  sulle varie componenti principali.

Componente Principale	1	2	3
Temperatura prodotto stazionario essiccamento primario (°C)	0.88	0.12	0.15
Perdita di peso media totale, g	0.95	-0.18	0.02
Deviazione Standard Totale, %	-0.68	-0.11	0.21
Perdita di peso media flaconi interni, g	0.95	-0.17	0.03
Deviazione Standard Flaconi Interni, %	-0.59	-0.04	-0.01
Perdita di peso media flaconi esterni, g	0.94	-0.19	0.02
Deviazione Standard Flaconi Esterni, %	-0.62	-0.09	0.34

Nelle tabelle sono evidenziati i valori maggiori in modulo delle colonne (per la Tabella 3.11) e delle righe (per la Tabella 3.12). Si ricorda che maggiore è il peso in valore assoluto, maggiore la variabile corrispondente avrà influenza sulla determinazione della componente principale in esame. Per le variabili  $y$  il maggior peso di una componente principale indica che questa è quella che meglio descrive la variabile  $y$  in esame.

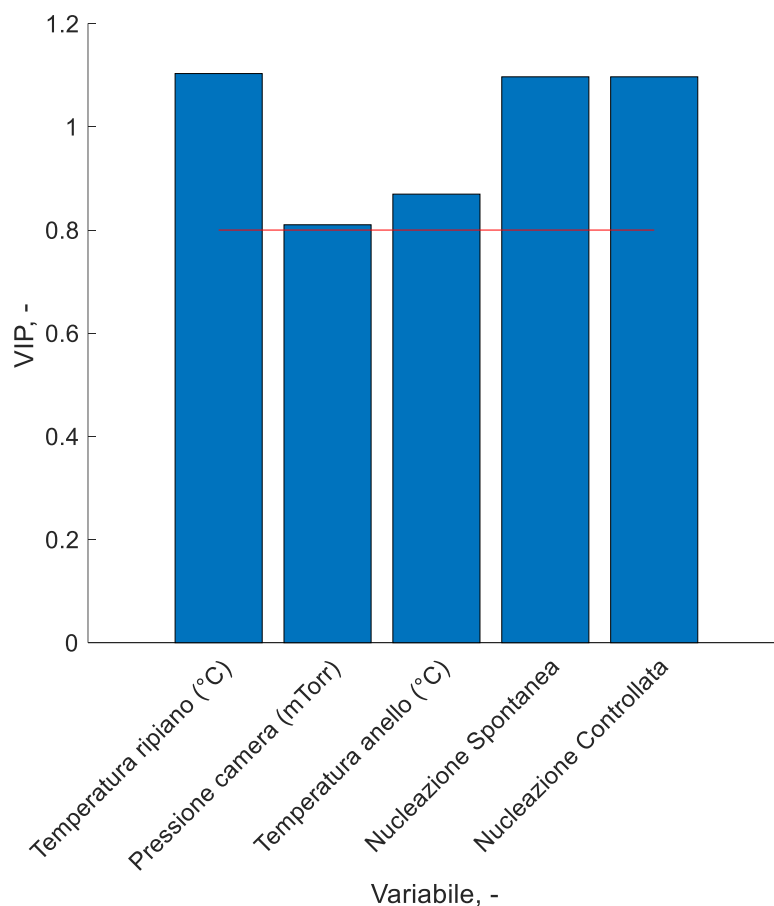
Dalla prima tabella si traggono le informazioni espresse precedentemente per via grafica. La componente principale 1 è, in pratica, unicamente descritta dalla temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario, la componente principale 2 dipende principalmente dalla tipologia di nucleazione, mentre la componente principale 3 dalla pressione della camera durante l'essiccamento primario. Si nota che la temperatura dell'anello, sia nella componente principale 2 che nella 3, abbia un effetto non trascurabile, mentre la pressione influenza anche la componente principale 2.

Dalla seconda tabella risulta evidente subito che la componente principale 1 è quella che determina in modo evidente tutte le variabili  $y$  del modello. L'aumento della temperatura del ripiano durante l'essiccamento primario (che determina la componente principale 1) comporterà l'aumento della perdita di peso media dei flaconi e della temperatura del prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario, e, al contempo, l'omogeneità del *batch* in termini di deviazione standard.

Al contempo, risulta che l'utilizzo della nucleazione controllata serva principalmente ad aumentare la perdita di peso media dei flaconi, andando anche ad abbassare la temperatura del prodotto allo stazionario. Non si ha, invece, un effetto preponderante sull'omogeneità del *batch* in termini di deviazione standard. Questo deriva dal fatto che le componenti principali 2 e 3 abbiano effetto opposto e comparabile sulle varie deviazioni standard. Questo è vero tranne nel

caso della deviazione standard dei flaconi esterni, in cui il peso della componente principale 3 è molto maggiore di quello della componente principale 2, ma tale aumento potrebbe essere attribuibile unicamente all'effetto combinato della pressione e della temperatura dell'anello. Ciò che risalta è che un aumento della pressione e un aumento della temperatura dell'anello peggiorino l'omogeneità dei flaconi esterni. Per quanto riguarda la temperatura dell'anello, questo è un comportamento che si riflette anche nella componente principale 2, in quanto più è bassa la temperatura dell'anello migliore sarà l'omogeneità in termini di deviazione standard dell'intero *batch*, migliorando maggiormente quella relativa ai soli flaconi esterni, cosa che conferma l'effetto positivo che il *LyoSim*® ha sul processo.

Per concludere si mostra il grafico del *VIP* Figura 3.34 per ogni variabile  $x$  considerata, che mostra come ogni variabile sia importante nella modellazione.



**Figura 3.34** *VIP* delle variabili  $x$ . Tutte le variabili considerate hanno un valore del *VIP* superiore al limite di 0.8.

La suddivisione delle osservazioni in due cluster nettamente separati a seconda del valore di temperatura impiegato lascia presumere la presenza di un qualche effetto non lineare non pienamente descritto dal modello.

Data l'esigua quantità di osservazioni non è stato possibile studiare in dettaglio questi comportamenti. Gli sviluppi futuri di questo lavoro non possono prescindere dalla introduzione di un terzo valore di temperatura e/o da un numero di prove sufficienti tali da poter calcolare un sotto modello per ognuna delle due temperature considerate. La creazione di un modello PLS su due gruppi di dati così ridotti potrebbe facilmente indurre a trarre conclusioni errate.



## 4 Conclusioni

Questo lavoro di Tesi ha avuto come scopo la verifica del corretto funzionamento del *MicroFD*<sup>®</sup>, valutando le sue potenzialità in ambito di ricerca per i cicli di liofilizzazione. I micro-liofilizzatori come il *MicroFD*<sup>®</sup>, date le loro ridotte dimensioni, si affacciano al mondo della liofilizzazione come possibili sostituti di liofilizzatori industriali, i quali possono comportare enorme consumo di prodotto e di risorse in fase di *process design*. I micro-liofilizzatori permettono di simulare, con una netta riduzione di prodotto utilizzato, ciò che accade all'interno di un liofilizzatore industriale, facilitando lo *scale-up*.

In generale, il ciclo di liofilizzazione permette di rimuovere l'acqua contenuta in una soluzione per ridurre fortemente la cinetica delle reazioni degradanti il prodotto contenuto come soluto, ed è costituito da tre fasi principali: congelamento, in cui si porta la soluzione ad una temperatura al di sotto del punto di fusione dell'acqua; essiccamento primario, in cui l'innalzamento della temperatura e l'abbassamento della pressione permettono la rimozione dell'acqua sottoforma di ghiaccio attraverso la sublimazione; essiccamento secondario, in cui un ulteriore innalzamento della temperatura permette la rimozione dell'acqua legata alle molecole di soluto. Durante il ciclo di liofilizzazione, i flaconi contenuti all'interno della camera di essiccamento hanno dei comportamenti in termini di temperatura raggiunta (e, quindi, di acqua rimossa) differenti a seconda della loro posizione all'interno del *batch*. I flaconi sono in genere distinti in tre categorie differenti: flaconi di bordo, quelli più vicini alle pareti della camera, flaconi centrali ma a contatto con i flaconi di bordo, flaconi centrali ma non a contatto con i flaconi di bordo. Questa distinzione deriva dal fatto che, sebbene il calore ricevuto dai flaconi viene fornito dal ripiano, la cui temperatura in un liofilizzatore è controllabile, i flaconi di bordo ricevono del calore addizionale rispetto ai restanti flaconi a causa dell'irraggiamento delle pareti della camera e anche da altre fonti. Questo viene chiamato "effetto di bordo" ed è la principale causa di disomogeneità all'interno di un *batch* sottoposto ad un ciclo di liofilizzazione. Questa disomogeneità si traduce non solo in una diversa rimozione di acqua per sublimazione durante l'essiccamento primario, ma anche in una diversa temperatura che potrebbe comportare la denaturazione del prodotto dei flaconi esterni se questa supera i limiti di temperatura quali temperatura di transizione vetrosa per un solido amorfo (come il saccarosio) o temperatura di eutettico per un solido cristallino (come il mannitolo).

Il *MicroFD*<sup>®</sup> è caratterizzato dalla presenza di un anello a temperatura controllabile, il *LyoSim*<sup>®</sup>, e di un sensore di flusso di calore integrato nel ripiano della camera di essiccamento, *Accuflux*<sup>®</sup>. L'anello del micro-liofilizzatore permette di ridurre l'effetto di bordo e questo lavoro di Tesi si è basato sull'effetto che questo ha sul processo al variare di alcuni parametri caratterizzanti il ciclo, quali temperatura del ripiano e pressione della camera.

Ogni prova condotta è stata eseguita utilizzando 3 ml di una soluzione al 5% in peso di saccarosio all'interno di 19 flaconi 6R, tubolari o *molded*. Per ogni parametro differente impostato all'inizio di ogni ciclo, si è effettuata una serie di tre prove condotte a diversa temperatura dell'anello in base alla temperatura media del prodotto rilevata dalle termocoppie: -1, -3 e -5°C. Ogni prova è stata condotta fino alla fase dell'essiccamento primario, la cui durata è rimasta costante e pari a 6 ore, non considerando l'essiccamento secondario. Mentre la fase di congelamento è stata variata solo nel modo in cui avveniva la nucleazione: spontanea, in una serie di prove, controllata, nell'altra, i parametri variati durante l'essiccamento primario sono stati la temperatura del ripiano (impostata pari a -20°C o 0°C) e la pressione della camera (impostata pari a 60 mTorr o 90 mTorr).

I risultati raccolti al termine del ciclo sono stati la perdita di peso media che interessava i flaconi dell'intero *batch*, quella dei flaconi esterni e quella dei flaconi interni, da cui è stato possibile valutarne la deviazione standard e la differente massa di acqua sublimata fra flaconi esterni ed interni, entrambi indice dell'omogeneità del *batch*. È stata inoltre calcolata la percentuale ricoperta dal calore ricevuto dal ripiano rispetto a quello totale necessario per la sublimazione dell'acqua al termine del ciclo ( $\%Q$ ), indice dell'impatto che l'effetto di bordo ha sul processo, e la temperatura media raggiunta dal prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario.

Inizialmente, è stata monitorata la temperatura della superficie dell'anello per valutare se fosse simile a quella impostata nel *MicroFD*®, ed è risultato che la superficie del *LyoSim*® presenta una temperatura sempre superiore al suo *setpoint*, andando a giustificare il valore sempre al di sotto del 70% del  $\%Q$ . Successivamente, si è valutato il ruolo che la temperatura del *LyoSim*® adottata, rispetto la temperatura media rilevata dalle termocoppie, ricopre nell'omogeneità del processo. Quello che risulta è che una temperatura più bassa delle pareti riduce l'effetto di bordo nel processo, aumentando la quantità di calore derivante dal ripiano rispetto alle altre fonti, e portando ad una maggior omogeneità all'interno del *batch*, riducendo sia la deviazione standard che la differenza di perdita di peso fra flaconi esterni ed interni. L'effetto positivo del *LyoSim*® è stato anche valutato variando la posizione delle termocoppie all'interno del *batch*, risultando maggiore con le termocoppie, utilizzate per il controllo della temperatura dell'anello, poste unicamente nei flaconi centrali.

L'analisi grafica e tabellare è stata effettuata confrontando i risultati di prove i cui parametri, eccetto uno, fossero identici. In questo modo, è stato possibile valutare ogni singolo parametro in modo indipendente. Ciò che risulta è che sia l'aumento della temperatura del ripiano che l'aumento della pressione della camera hanno come risultato un aumento della massa sublimata di acqua durante l'essiccamento primario, senza intaccare l'omogeneità del processo in termini di differenza sulle perdite di peso fra flaconi esterni ed interni. A differenza dell'aumento della temperatura, l'aumento di pressione non porta ad una diversa temperatura raggiunta dal prodotto allo stazionario dell'essiccamento primario. Anche l'utilizzo della nucleazione controllata sembra influenzare solamente la quantità di acqua sublimata, aumentandola, e non portando a differenze evidenti sull'omogeneità del *batch*.

L'analisi *PLS* ha permesso di verificare i risultati ottenuti per via tabellare e grafica. Inizialmente, sono state valutate tutte le variabili del processo, considerando nella modellazione anche le prove che si differenziavano per la disposizione delle termocoppie che determinavano la temperatura del *LyoSim*®. L'ostacolo principale nell'utilizzo di un modello *PLS* con un *data set* limitato è che ogni singola prova o variabile considerata può costituire l'origine di rumore all'interno del modello che si origina. La considerazione della variabile "disposizione delle termocoppie" portava il modello a creare dei *cluster* in cui erano contenute le osservazioni a seconda della disposizione di termocoppie adottata. Questa variabile costituiva quella con il ruolo maggiore all'interno della modellazione, portando al mascheramento della maggior parte delle restanti. Perciò, nel successivo tentativo di modellazione, non è considerata. Il nuovo modello ottenuto, tuttavia, ha evidenziato come la differenza di perdita di peso fra flaconi esterni ed interni e la  $\%Q$  non fossero altro che rumore all'interno del *dataset*. Solo la rimozione di questi due ha permesso di ottenere un modello la cui bontà di predizione fosse più che sufficiente, considerata la limitata quantità di dati disponibili. Quest'ultimo ha mostrato come la temperatura sia la variabile che maggiormente influenza il modello, ma ha inoltre permesso di mostrare l'importanza della tipologia della nucleazione sul processo.

Gli studi da effettuare sul *MicroFD*® sono ancora molti e variegati. Innanzitutto, sarebbe opportuno studiare il comportamento del micro-liofilizzatore durante l'essiccamento secondario, fase non trattata in questo lavoro di Tesi. Altre variabili possono essere prese in



considerazione per valutare il comportamento del *MicroFD*®. Il *MicroFD*® permette di ospitare diverse dimensioni del *LyoSim*®, utilizzabili a seconda delle dimensioni dei flaconi (attualmente è possibile utilizzare un *LyoSim*® per i flaconi 6R e uno per i flaconi 10R). È stato testato unicamente quello per i flaconi 6R, quindi cambiare tipologia di flaconi anello potrebbe essere uno studio aggiuntivo da andare ad effettuare sull'apparecchiatura. Il volume di riempimento di un flacone, determinato dalla quantità di soluzione inserita, e la soluzione utilizzata, costante al 5% in peso di saccarosio in acqua distillata, non sono mai state variate durante questo lavoro di Tesi, si potrebbe pertanto cambiare soluto (utilizzando per esempio il mannitolo il quale è un solido cristallino a differenza del saccarosio che è un solido amorfo), aumentarne la concentrazione o aumentare il volume di soluzione in ogni flacone. La temperatura impostata all'anello è sempre stata -1, -3 o -5°C rispetto la temperatura media del prodotto. Sarebbe opportuno verificare il comportamento del micro-liofilizzatore a temperature ancora più basse (si ricorda che il *LyoSim*® può raggiungere temperature fino a -15°C rispetto la temperatura media del prodotto) o più alte (fino a +15°C).

Un *data set* più ampio permetterebbe un'analisi più approfondita sulle potenzialità del *MicroFD*®, consentendo di approfondire il modello statistico proposto precedentemente. Sarebbe opportuno effettuare altre prove con altre temperature di ripiano e pressioni durante l'essiccamento primario, oltre ad abbassare ulteriormente la temperatura dell'anello per valutare se anche a temperature più basse il suo effetto sia positivo o meno al processo. I risultati ottenuti in questo lavoro di Tesi possono essere, pertanto, un punto di partenza per uno studio più ampio sul liofilizzatore.

In conclusione, il *MicroFD*® ha la predisposizione per affermarsi come un *must have* dei laboratori per lo studio del ciclo di liofilizzazione, in quanto riesce a fornire all'utilizzatore un potente strumento in grado di simulare gli andamenti delle temperature dei prodotti in un liofilizzatore industriale, grazie anche alla sua interfaccia *user friendly*.



## 5 Lista dei Simboli

$a$	Indice della componente principale ( $a = 1, 2, \dots, A$ )
$A$	Numero delle componenti principali ricavate nel modello PLS
$\mathbf{c}_a$	Vettore dei pesi di $\mathbf{Y}$ per la componente principale $a$
$\mathbf{C}$	Matrice ( $M * A$ ) dei pesi di $\mathbf{Y}$ con le colonne costituite da $\mathbf{c}_a$
$\mathbf{e}_i$	Vettore dei residui della componente $i$ -esima utilizzando $A$ componenti principali
$\mathbf{F}$	Matrice ( $N * M$ ) dei residui di $\mathbf{Y}$ del modello PLS
$\Delta H_s$	Calore di sublimazione acqua ( $2.83 * 10^6$ J/kg)
$J_q$	Flusso di calore, $W m^{-2}$
$J_w$	Flusso di materia, $kg s^{-1}m^2$
$K$	Numero di variabili $x$ considerate nel modello PLS
$K_v$	Coefficiente totale di scambio di calore fra ripiano e prodotto al fondo del flacone, $W m^{-2} K^{-1}$
$K_{v,shelf}$	Coefficiente di scambio di calore rilevato dal <i>MicroFD</i> ®, $W m^{-2} K^{-1}$
$M$	Numero di variabili $y$ considerate nel modello PLS
$\Delta m$	Perdita di peso, g
$\Delta m_{INT}$	Perdita di peso dei flaconi centrali, g
$\Delta m_{EXT}$	Perdita di peso dei flaconi di bordo, g
$\Delta m_{TOT}$	Perdita di peso dei flaconi dell'intero <i>batch</i> , g
$N$	Numero osservazioni considerate nel modello PLS
$\mathbf{p}_a$	Vettore dei <i>loadings</i> di $\mathbf{X}$ per la componente principale $a$
$\mathbf{P}$	Matrice dei <i>loadings</i> di $\mathbf{X}$ con le colonne costituite da $\mathbf{p}_a$
$\%Q$	Percentuale calore necessario alla sublimazione della massa persa derivante dal ripiano
$Q^2$	Indice della bontà di predizione del modello PLS
$Q_{ACCUFLUX}$	Calore rilevato da <i>Accuflux</i> ®, W
$Q_{SHELF,ACCUM}$	Calore totale durante essiccamento primario, J
$R^2_X$	Coefficiente di correlazione per le variabili $x$ per il modello PLS
$R^2_Y$	Coefficiente di correlazione per le variabili $y$ per il modello PLS
$R_p$	Resistenza totale al flusso di vapore, $Pa m^2 s kg^{-1}$
$s^2_a$	Varianza della componente principale $a$
$SPE_i$	<i>Square Prediction Error</i> dell'osservazione $i$ -esima
$\Delta t$	Durata essiccamento primario, s
$t$	Tempo, h
$\mathbf{t}_a$	Vettore degli <i>scores</i> di $\mathbf{X}$ per la componente principale $a$
$\mathbf{T}$	Matrice ( $N * A$ ) degli <i>scores</i> di $\mathbf{X}$ con le colonne costituite da $\mathbf{t}_a$
$T_B$	Temperatura del prodotto al fondo del flacone, K
$T_i$	Temperatura all'interfaccia di sublimazione, K
$T^2_i$	Distanza di Mahalanobis della proiezione dell'osservazione $i$ -esima dal centro dell'iperspazio definito da $A$ componenti principali
$T_{p,avg}$	Temperatura media prodotto rilevata dalle termocoppie, K
$T_{p,i}$	Temperatura prodotto rilevata dalla termocoppia $i$ , K
$T_S$	Temperatura del ripiano, K
$\mathbf{u}_a$	Vettore degli <i>scores</i> di $\mathbf{Y}$ per la componente principale $a$
$\mathbf{U}$	Matrice ( $N * A$ ) degli <i>scores</i> di $\mathbf{Y}$ con le colonne costituite da $\mathbf{u}_a$

<i>VIP</i>	<i>Variable Importance in the Projection</i> , importanza della variabile $x$ nel modello <i>PLS</i>
$\mathbf{w}_a$	Vettore dei pesi di $\mathbf{X}$ per la componente principale $a$
$\mathbf{W}$	Matrice ( $K * A$ ) dei pesi di $\mathbf{X}$ con le colonne costituite da $\mathbf{w}_a$
$\mathbf{w}^*_a$	Vettore dei pesi di $\mathbf{X}$ per la componente principale $a$ indipendenti fra le componenti
$\mathbf{W}^*$	Matrice ( $K * A$ ) dei pesi di $\mathbf{X}$ con le colonne costituite da $\mathbf{w}^*_a$
$x$	Variabile sempre disponibile per il modello <i>PLS</i>
$\hat{x}$	Predizione tramite il modello <i>PLS</i> della variabile $x$
$\mathbf{X}$	Matrice ( $N * K$ ) delle variabili $x$
$y$	Variabile non sempre disponibile per il modello <i>PLS</i>
$\hat{y}$	Predizione tramite il modello <i>PLS</i> della variabile $y$
$\mathbf{Y}$	Matrice ( $N * M$ ) delle variabili $y$

## 6 Bibliografia

- Adams GDJ and Irons LI, 1993, Some implications of structural collapse during freeze-drying using *Erwinia caratovora* L-asparaginase as a model. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **58** (1), 71–76.
- Akarachantachote N., Chadcham S., and Saithanu K., 2014, Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, **94** (3), 307-322.
- Bellows RJ and King CJ, 1972, Freeze-drying of aqueous solutions: maximum allowable operating temperature. *Cryobiology*, **9**, 559–561.
- Bosca S., Barresi A. A. and Fissore D., 2013, Use of a Soft-Sensor for the Fast Estimation of Dried Cake Resistance During a Freeze-Drying Cycle. *International Journal of Pharmaceutics*, **451**, 23–33.
- Chen R., Slater N.K., Gatlin L. A., Kramer T. and Shalaev E. Y., 2008, Comparative rates of freeze-drying for lactose and sucrose solutions as measured by photographic recording, product temperature, and heat flux transducer. *Pharmaceutical Development and Technology*, **13** (5), 367–374.
- Dunn K., 2018, *Process Improvement Using Data*. Available at <https://learnche.org/pid> (Accessed: 24 October 2018).
- Fissore D., 2013, Freeze drying of pharmaceuticals. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Fourth Edition*. Taylor and Francis: New York, 1723-1737.
- Fissore D., Pisano R. and Barresi A.A., 2018, Process analytical technology for monitoring pharmaceuticals freeze-drying – A comprehensive review, *Drying Technology*, **36** (15) 1839-1865.
- Gan K.H., Bruttini R., Crosser O.K. and Liapis A.I., 2005, Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, **48** (9) 1675–1687.
- Konrad I., Pauli V., Friess W., Havel A., Winter G., and Freitag A., 2016, Integrated heat flux measurements as a new PAT tool in freeze drying. Presented at 2016 *Peptalk*, San Diego, CA, 20 January 2016.
- Nireesha G.R., Divyal L., Sowmya C., Venkateshan N., Niranjana Babu M. and Lavakumar V., 2013, Lyophilization/Freeze Drying - An Review, *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, **3** (4), pp. 87–98.
- Obeidat W.M., Sahni E., Kessler W. and Pikal M.J., 2017, Development of a mini-freeze dryer for material-sparing laboratory processing with representative product temperature history, *AAPS PharmSciTech*, **19** (2), pp. 599–609.
- Oetjen G.W. and Haseley P., 2004, *Freeze-Drying: Second, Completely Revised and Extended Edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Mörlenbach.
- Patapoff, T. W. and Overcashier, D. E., 2002, The importance of freezing on lyophilization cycle development, *BioPharm International*, **15** (3), pp. 16–21.
- Patel SM, Jameel F and Pikal MJ, 2010, The effect of dryer load on freeze drying process design, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99** (10), 4363–4379.

- Pikal M. J., 1994, Freeze-drying of proteins: process, formulation, and stability, in “*Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*” (Cleland J.L., Langer R., Eds.), Chap. 8. American Chemical Society; **567**, pp. 120–133.
- Pikal M.J., Roy M.L. and Shah S., 1984, Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **73** (9) 1224–1237.
- Pikal M.J., Bogner R., Mudhivarthi V., Sharma P. and Sane P., 2016, Freeze-drying process development and scale-up: scale-up of edge vial versus center vial heat transfer coefficients, *Kv, Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105** (11), 3333–3343.
- Rambhatla S. and Pikal M.J., 2003, Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: Atypical radiation and the edge vial effect, *AAPS PharmSciTech*, **4** (2) article 14.
- Scutellà B., Passot S., Bourlés E., Fonseca F. and Tréléa I.C., 2017a, How vial geometry variability influences heat transfer and product temperature during freeze-drying, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **106** (3) 770–778.
- Scutellà B., Plana-Fattori A., Passot S., Bourlés E., Fonseca F., Flick D. and Tréléa I.C., 2017b, 3D mathematical modelling to understand atypical heat transfer observed in vial freeze-drying, *Applied Thermal Engineering*, **126**, pp. 226–236.
- Searles J.A., Carpenter J.F. and Randolph T.W., 2001, Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T(g)’ in pharmaceutical lyophilization, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **90** (7), 872–887.
- Thompson T. N., 2013, LyoPAT™: Real-time monitoring and control of the freezing and primary drying stages during freeze-drying for improved product quality and reduced cycle times, *American Pharmaceutical Review*, **16** (7) pp. 1–10.
- Tsourouflis S., Flink JM and Karel M., 1976, Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: effect of temperature, moisture content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **27** (6), 509–519.
- Wang D.Q., Hey J.M. and Nail S.L., 2004, Effect of collapse on the stability of freeze-dried recombinant factor VIII and alpha-amylase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **93** (5), 1253–1263.
- Wold S., Johansson E. and Cocchi M., 1993, PLS-Partial least square analysis, in “*3D-QSAR in drug design. Volume 1: theory, methods and applications*”, (Kubinyi H., Ed.), ESCOM Science Publisher, Leiden, 523-550.
- Wold S., Sjöström M. and Eriksson L., 2001, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **58**, 109–130.
- Wold S., Albano C., Dunn III W. J., Edlund U., Esbensen K., Geladi P., Hellberg S., Johansson E., Lindberg W. and Sjostrorn M., 1984, Multivariate data analysis in chemistry, in “*Chemometrics, Mathematics and Statistics in Chemistry*”, (B.R. Kowalski, Ed.), Springer, Dordrecht, 17-95.