

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

**Tesi di Laurea Magistrale in
Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

**PROTOCOLLI SPERIMENTALI PER L'IDENTIFICAZIONE
DI MODELLI NEL PROCESSO DI LIOFILIZZAZIONE:
UNO STUDIO COMPARATIVO**

Relatore: Prof. Massimiliano Barolo

Correlatore: Dr. Riccardo De Luca

Dr. Emanuele Tomba

Laureanda: ARIANNA CAILOTTO

ANNO ACCADEMICO 2019 – 2020

Riassunto

I vaccini sono prodotti, ottenuti generalmente in soluzione. Alcuni di essi, prima dello stoccaggio necessitano della rimozione del solvente al fine di garantire il mantenimento nel tempo della qualità del prodotto. Nel caso in cui il vaccino prodotto sia termosensibile, non potendo operare ad alte temperature, per la rimozione del solvente si fa ricorso generalmente al processo di liofilizzazione.

In questa Tesi è considerata la fase più critica del processo di liofilizzazione, ossia quella di essiccamento primario. In particolare, viene confrontata l'efficacia di tre diversi metodi impiegabili per ottenere dati sperimentali utili all'identificazione di modelli a principi primi dell'essiccamento primario: (i) metodo tradizionale, basato su campagne sperimentali a pressioni e temperature assegnate e costanti, determinate in base all'esperienza; (ii) metodo SMART, basato sulla generazione automatica di un protocollo sperimentale tramite il software associato allo specifico liofilizzatore utilizzato in questo studio; (iii) progettazione ottimale di esperimenti basata su modello (*model-based design of experiments* o MBDoE), che permette di generare protocolli sperimentali ad alto contenuto informativo basati sulla struttura del modello da identificare.

Questa Tesi è stata svolta attraverso uno stage condotto presso lo stabilimento GSK Vaccines (Siena) nell'ambito del progetto DIGI-LIO "Verso la digitalizzazione dell'industria farmaceutica: generazione di dati ad alto contenuto di informazione per l'ottimizzazione di processi industriali di liofilizzazione" finanziato nell'ambito del programma Uni-Impresa 2017 promosso dall'Università degli Studi di Padova.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Dallo sviluppo del farmaco alla produzione industriale: il processo di liofilizzazione	3
1.1 I VACCINI.....	3
1.1.1 Azione dei vaccini.....	4
1.1.2. Sviluppo dei vaccini.....	6
1.1.3. Produzione di vaccini.....	7
1.2 IL PROCESSO DI LIOFILIZZAZIONE	9
1.2.1 Apparecchiatura di liofilizzazione: caratteristiche generali	10
1.2.2 Fase 1: Congelamento	11
1.2.3 Fase 2: Essiccamento primario	11
1.2.4 Fase 3: Essiccamento secondario.....	13
1.3 SISTEMI DI MISURA.....	13
1.3.1 Misure di temperatura	13
1.3.2 Misure di pressione	16
1.4 OBIETTIVO DELLA TESI	18
CAPITOLO 2 – Modellazione della fase di essiccamento primario	21
2.1 IL MODELLO PSEUDO-STAZIONARIO	22
2.1.1 Le equazioni del modello pseudo-stazionario	22
2.1.2 Assunzioni, vantaggi e limiti del modello pseudo-stazionario	25
2.2 LA TECNOLOGIA SMART	27
2.3 MODELLO DINAMICO	32
CAPITOLO 3 – Prove sperimentali, stima parametrica e confronto tra i metodi	37
3.1 SET-UP SPERIMENTALE	37
3.2 IDENTIFICAZIONE DI MODELLO: I TRE APPROCCI	40

3.2.1 Identificazione e convalida del modello pseudo-stazionario con metodo gravimetrico e stima da termocoppie.....	41
3.2.1.1 Fase di calibrazione.....	42
3.2.1.2 Fase di convalida.....	49
3.2.2 Identificazione di modello con tecnologia SMART	51
3.2.2.1 Fase di calibrazione.....	52
3.2.2.2 Fase di convalida.....	53
3.2.3 Identificazione e convalida del modello dinamico tramite esperimento progettato con MBD _{oE}	55
3.2.3.1 Fase di calibrazione.....	56
3.2.3.2 Fase di convalida	59
3.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....	62
CONCLUSIONI	65
NOMENCLATURA.....	67
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	71
RINGRAZIAMENTI	75

Introduzione

La liofilizzazione è un processo di essiccamento largamente utilizzato nell'industria farmaceutica per prolungare la vita utile di prodotti instabili in soluzione acquosa e termosensibili (ad esempio, vaccini) ed evitare alterazioni irreversibili della qualità del prodotto finale. Il processo di liofilizzazione nei vaccini consiste nel rimuovere il solvente (generalmente acqua) a partire dal prodotto preventivamente congelato, tramite sublimazione in condizioni di vuoto spinto e a basse temperature, impostate dipendentemente dalle caratteristiche della formulazione del prodotto. Esso consiste principalmente in tre fasi: congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario. La fase di essiccamento primario, argomento centrale di questo lavoro di Tesi, è considerata la più critica del processo sia in termini di durata (pari al 70-80 % della durata totale della liofilizzazione), sia in termini energetici, configurandosi quindi come fase del processo con il massimo impatto economico.

Teoricamente, la durata dell'essiccazione primaria potrebbe essere accelerata manipolando in modo ottimale sia la temperatura delle piastre su cui sono disposti i flaconi all'interno del liofilizzatore, sia la pressione della camera del liofilizzatore stesso; tuttavia, queste variabili devono rispettare rigidi vincoli per evitare condizioni critiche per la struttura del farmaco e, di conseguenza, la perdita di qualità del prodotto. La temperatura del prodotto deve essere solitamente mantenuta a valori inferiori alla temperatura di collasso della specifica formulazione trattata e il flusso totale di sublimazione uscente dai flaconi deve essere mantenuto inferiore al cosiddetto *choked flow* tra la camera e il condensatore di vapore (Patel et al., 2010). Dati questi stretti vincoli, nella pratica industriale la fase di essiccamento primario è tipicamente il risultato di campagne sperimentali basate sull'esperienza e la conoscenza delle caratteristiche del prodotto e il protocollo che ne risulta è quindi spesso sub-ottimale. L'ottimizzazione della ricetta può essere tuttavia ottenuta in un periodo di tempo relativamente breve se è disponibile un modello matematico affidabile del processo che ne descrive i meccanismi fondamentali. L'identificazione di un modello matematico richiede tuttavia una profonda conoscenza del processo e la realizzazione di campagne sperimentali potenzialmente lunghe e costose.

In questo lavoro di Tesi viene eseguito uno studio comparativo tra tre differenti approcci per l'acquisizione di dati con lo scopo di velocizzare l'identificazione di modelli di essiccamento primario. Nel primo approccio viene utilizzato un modello pseudo stazionario (Fissore et al. (2011) e sulla base di esso applicato un metodo di calibrazione standard comunemente utilizzato

anche nella pratica industriale (Pikal *et al.* (1984)) per ottenere la stima dei parametri del modello; nel secondo approccio si fa utilizzo del modello pseudo-stazionario ma la stima parametrica è ottenuta attraverso la tecnologia SMART, integrata nel liofilizzatore utilizzato in questo studio; nel terzo approccio è utilizzato un modello dinamico, la cui stima parametrica è ottenuta tramite un esperimento progettato con approccio MBDoE. Il confronto è basato sia sulla valutazione della bontà del *fitting* dei dati sperimentali ottenuti per ciascuno caso, sia sulla quantità di esperimenti necessari per l'identificazione stessa.

Il lavoro di Tesi è suddiviso in tre capitoli. Nel primo capitolo viene fornita una panoramica generale della produzione dei vaccini; si procede con la descrizione del processo di liofilizzazione e delle sue fasi principali; si descrive l'unità operativa utilizzata per gli esperimenti; si conclude infine con i sistemi di misura utilizzati nelle prove sperimentali.

Nel secondo capitolo vengono presentati i tre modelli matematici che descrivono la fase di essiccamento primario utilizzati in questo studio; si descrivono in dettaglio le equazioni costitutive e vantaggi, assunzioni e limiti intrinseci a ciascun modello e si fornisce una breve descrizione della tecnologia innovativa SMART associata al liofilizzatore utilizzato per gli esperimenti in questo lavoro di Tesi.

Nel terzo capitolo si presentano le specifiche di processo adottate, le prove sperimentali eseguite ed i risultati ottenuti per ciascun approccio considerato.

Il lavoro di Tesi si conclude con considerazioni finali riassuntive relative al lavoro eseguito e proposte per eventuale lavoro futuro.

Capitolo 1

Dallo sviluppo del farmaco alla produzione industriale: il processo di liofilizzazione

Il lavoro di Tesi si basa sul processo di liofilizzazione applicato a specifici formati/infiamenti dei vaccini. Tuttavia, l'approccio utilizzato è generale e non limitante a questa categoria di prodotto. In questo capitolo viene presentata una breve descrizione relativa alle tipologie di vaccino esistenti, alle fasi di sviluppo del prodotto e al processo di produzione. Successivamente viene presentata la parte del processo produttivo inerente alla liofilizzazione del vaccino con dettaglio sulle fasi che lo compongono, la generica struttura di un liofilizzatore ed i sistemi di misura installati nell'impianto. Infine, si conclude con le motivazioni e gli obiettivi del lavoro di Tesi.

1.1 I vaccini

I vaccini sono medicinali biologici (contenenti cioè una o più sostanze attive derivate da una fonte biologica od ottenuti attraverso un processo biologico) che hanno lo scopo di prevenire una o più malattie infettive attraverso la stimolazione del sistema immunitario (produzione di anticorpi o attivazione di specifiche cellule). Esso è in grado di aumentare la resistenza ad uno specifico agente patogeno dopo essere stato infettato ripetutamente ed acquisire successivamente la cosiddetta "immunità attiva".

Le sostanze attive dei vaccini sono rappresentate da:

- Microrganismi (batteri o virus) opportunamente inattivati o uccisi in maniera tale da stimolare il sistema immunitario senza causare la malattia;
- Parti specifiche (antigeni) dei microrganismi che sono coinvolte direttamente nella risposta del sistema immunitario contro l'agente patogeno;
- Sostanze prodotte dall'agente patogeno (tossine) coinvolte nei meccanismi di generazione della malattia, previa inattivazione.

Oltre alle componenti attive, alcuni vaccini contengono sostanze “adiuvanti” che consentono il raggiungimento di un’adeguata risposta del sistema immunitario con minore quantità di antigene. Inoltre, alcune formulazioni prevedono sostanze conservanti e/o stabilizzanti per mantenere inalterate le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche desiderate per il prodotto finale (ad esempio, pH, immunogenicità, sterilità).

La quantità delle sostanze adiuvanti, conservanti e stabilizzanti contenute nei vaccini è soggetta a limiti di legge, stabiliti a livello europeo da specifici organismi regolatori della Commissione Europea (AIFA, Agenzia Italiana del Farmaco (2018)).

1.1.1 Azione dei vaccini

I vaccini inducono una risposta del sistema immunitario della persona vaccinata (immunizzazione) simile a quella causata dall’infezione naturale (o, più in generale, dal contatto con il virus o il batterio presente in natura), senza innescare i meccanismi che sono alla base dei segni e dei sintomi della malattia naturale. Per immunizzazione (o immunità attiva) si intende il processo attraverso il quale il nostro sistema immunitario impara a conoscere i microrganismi e a rispondere alla loro presenza in maniera rapida ed efficace al fine di neutralizzare gli effetti nocivi. Si tratta di un evento legato all’interazione tra l’agente patogeno ed il sistema immunitario che può avvenire o in seguito al contatto con il microrganismo “selvaggio” o in seguito ad una vaccinazione. Il sistema immunitario è costituito da un insieme complesso di cellule circolanti (globuli bianchi) e di organi (midollo osseo, linfonodi, milza) che agisce come difesa del nostro organismo. Il ruolo generale di questo sistema è quello di riconoscere come proprio tutto ciò che appartiene al nostro organismo e come estranee le cellule di altri organismi, in modo tale da potersi difendere, se necessario. Le cellule che partecipano allo sviluppo dell’immunità acquisita indotta dal vaccino o dalla malattia sono rappresentate essenzialmente da quelle ad azione fagocitaria e dai linfociti. Questi ultimi si distinguono in linfociti di tipo B che sono in grado di produrre gli anticorpi (immunità umorale) e linfociti T che sono in grado di intervenire direttamente o indirettamente sulle cellule infette (immunità cellulo-mediata). Una parte dei linfociti attivati si trasforma in cellule della memoria ed è in grado di persistere nel tempo allo scopo di poter fronteggiare un successivo attacco da parte del microrganismo. Proprio questo meccanismo di selezione e mantenimento di cellule della memoria per ogni specifico microrganismo (memoria immunologica) è alla base dell’efficacia della vaccinazione e determina la capacità del sistema immunitario di ricordare quali microrganismi estranei sono entrati in contatto con l’organismo in passato e di rispondere

velocemente. Senza le vaccinazioni il corpo umano può impiegare fino a due settimane di tempo per produrre una quantità di anticorpi sufficiente a contrastare uno specifico microrganismo; Per alcuni vaccini (principalmente i vaccini inattivati) è necessario inoltre fare dei richiami, cioè ripetere la somministrazione a distanza di tempo. Il numero di richiami necessari e la frequenza con cui vengono effettuati dipendono dalle caratteristiche sia del vaccino, sia dell'agente patogeno.

I vaccini forniscono vari livelli di protezione a seconda della patologia che si vuole prevenire. Per le malattie non trasmissibili da uomo a uomo (ad esempio il tetano), i vaccini garantiscono la protezione della persona vaccinata (protezione individuale). Per le malattie trasmissibili da uomo a uomo (ad esempio il morbillo), i vaccini non proteggono solo la persona vaccinata ma garantiscono la protezione della comunità, riducendo la diffusione di malattie trasmissibili all'interno di una popolazione. L'infezione si diffonde da persona a persona quando una persona infetta entra in contatto con una persona sensibile. Qualora il numero di persone immuni superi un determinato valore soglia, la trasmissione dell'infezione viene interrotta; si precisa che questo evento si verifica prima del raggiungimento di una copertura vaccinale al 100% come rappresentato in Figura 1.1 (Brockmann, 2017).

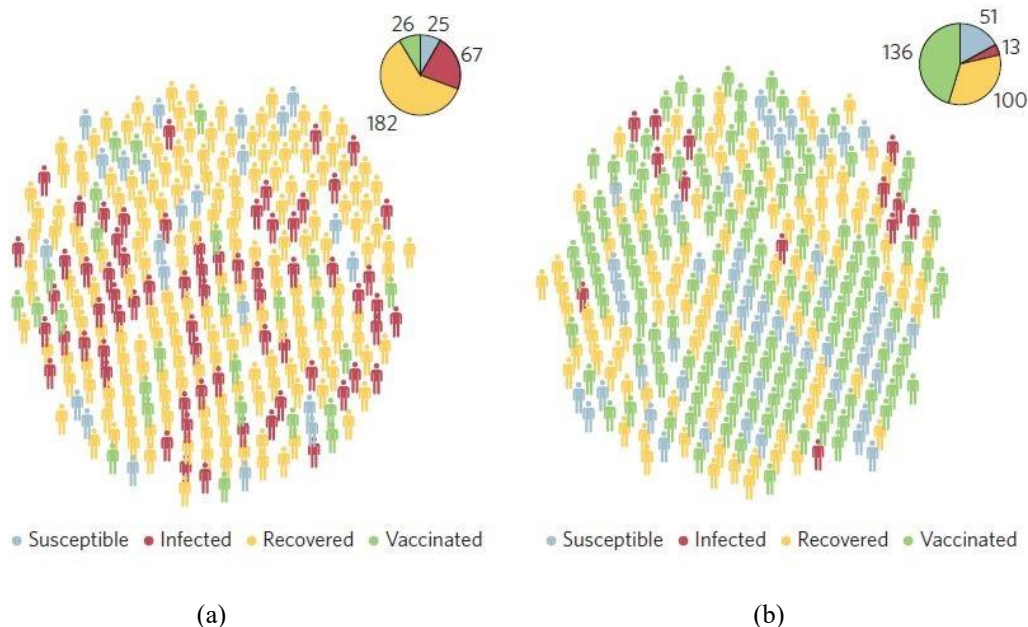


Figura 1.1 Funzionamento dell'immunità di gregge. Gli individui infetti possono trasmettere la malattia agli individui sensibili in loro vicinanza. Gli individui infettati guariscono e diventano immuni dopo qualche tempo. Nuovi nati entrano a far parte della popolazione, sia vaccinati che sensibili: a) Probabilità di vaccinazione molto bassa, la malattia prevale nella popolazione poiché i nuovi nati sono sensibili e trasmettono la malattia; b) L'intenzione di vaccinarsi è aumentata, la trasmissione è limitata e la malattia è destinata a scomparire (Brockmann, 2017).

La percentuale di individui immuni in una popolazione sopra la quale una malattia non si propaga viene definita “soglia dell’immunità di gregge”. Questa percentuale varia a seconda di una serie di fattori tra cui la virulenza e la trasmissibilità di un determinato agente infettivo, l’efficienza e la copertura complessiva del vaccino e la copertura vaccinale della popolazione a rischio (Brockmann, 2017).

1.1.2. Sviluppo dei vaccini

Lo sviluppo di un vaccino inizia dalla conoscenza del microrganismo responsabile della malattia che si intende prevenire e delle sue modalità d’interazione con l’organismo umano. Inizialmente si effettuano studi sperimentali in vitro, in base ai quali è possibile stabilire la composizione qualitativa e quantitativa ideale di un vaccino (tipologia e quantità della componente attiva e di tutte le altre sostanze previste). Una volta definito questo aspetto, il potenziale vaccino viene sottoposto a una serie di sperimentazioni pre-cliniche che includono studi in vitro e su modelli animali al fine di definire il meccanismo d’azione (cioè la capacità di produrre la risposta immunitaria), il profilo tossicologico e le prime evidenze di efficacia e sicurezza su un organismo vivente complesso. Si precisa che, nel caso di vaccini multicomponente, in questa fase viene studiata anche l’interazione tra le differenti componenti attive del vaccino. Selezionata la formulazione più promettente, questa viene avviata alla fase clinica preliminare sull’uomo, generalmente costituita da quattro fasi; le prime tre precedono l’autorizzazione all’immissione in commercio e la quarta viene condotta quando il vaccino è già disponibile sul mercato. Durante le prime tre fasi viene confermata:

- l’efficacia del vaccino in termini di tipologia e persistenza della risposta immunitaria e capacità di riduzione della probabilità di sviluppare la malattia dopo la vaccinazione;
- la sicurezza del vaccino in termini di eventi avversi attribuibili e non attribuibili al vaccino e di possibili problemi legati alle caratteristiche dei soggetti come l’età, il sesso e le condizioni di salute.

Le tre fasi si differenziano fondamentalmente per il progressivo aumento della popolazione trattata con il vaccino. Gli studi di fase tre sono: (i) controllati, dal momento che i soggetti trattati con il vaccino in studio sono confrontati con altrettanti soggetti trattati con un vaccino simile già autorizzato o con un trattamento inerte (placebo); (ii) randomizzati, dal momento che la suddivisione dei soggetti fra l’uno e l’altro trattamento avviene in maniera casuale. Questa tipologia di studi rappresenta lo strumento più solido del metodo scientifico per dimostrare l’efficacia e la sicurezza di un prodotto medicinale, inclusi i vaccini, in quanto permette di

attribuire con ragionevole certezza le differenze osservate nei soggetti sottoposti al vaccino “nuovo” rispetto a soggetti non vaccinati o sottoposti al vaccino già esistente.

Gli studi di fase quattro (o studi post-autorizzativi) vengono condotti dopo la commercializzazione e hanno l’obiettivo di verificare l’efficacia e la sicurezza del vaccino nelle sue reali condizioni d’uso, di valutarne l’utilizzo in particolari sottogruppi di popolazioni e condizioni patologiche (per esempio in concomitanza a malattie che potrebbero modificare l’efficacia e la sicurezza del vaccino) e il rapporto costo-beneficio rispetto alla malattia e ad altri vaccini.

Tutte le varie fasi dello sviluppo di un vaccino sono necessarie ad ottenere informazioni il più possibile chiare ed esaustive in merito a indicazioni, controindicazioni, avvertenze speciali, benefici e rischi del prodotto; dal momento che i vaccini vengono somministrati a scopo preventivo in una popolazione sana, è infatti necessario che le percentuali di efficacia siano molto alte e che il beneficio sia molto superiore al rischio per evitare l’interruzione del processo di sviluppo prima dalla commercializzazione. Tutti gli studi effettuati durante lo sviluppo di un vaccino devono rispondere agli standard internazionali di etica e qualità scientifica previsti dalle norme di buona pratica clinica, codificate a livello globale (*Good Clinical Practices*, GCP).

In Italia, l’Agenzia italiana del farmaco (AIFA) segue, a partire dalle fasi di sviluppo, tutte le fasi di controllo qualità, sicurezza ed efficacia del vaccino tramite l’analisi della documentazione fornita in fase di autorizzazione, l’ispezione dei reparti di produzione, la verifica dell’applicazione degli standard di buona fabbricazione (*Good Manufacturing Practices*, GMP) e il controllo di stato di ogni lotto prima del suo rilascio. La documentazione contiene tutti i dati delle materie prime utilizzate, il processo di produzione e tutti i risultati delle sperimentazioni cliniche e non cliniche. Inoltre, in caso di commercio estero dei medicinali, le apposite entità regolatorie devono approvare la commercializzazione del lotto a seguito di ispezioni standardizzate specifiche (Vaccines Europe, 2020).

1.1.3. Produzione di vaccini

Per quanto concerne la fase di produzione, l’obiettivo consiste nel raggiungimento della qualità di prodotto richiesta tramite l’identificazione di un processo produttivo al tempo stesso robusto e flessibile (i.e., in grado di mantenere il prodotto in specifica ma allo stesso tempo consentire un rapido trasferimento di processo al variare della formulazione utilizzata), in maniera da garantire una rapida risposta alla crescente domanda di vaccini (come quelli di tipo pediatrico) nuovi ed emergenti.

Il processo di produzione dei vaccini è un processo biologico che copre da 6 a 36 mesi e comprende le fasi di formulazione, produzione, confezionamento, analisi e rilascio del vaccino finale. Il *flowsheet* del processo di produzione dei vaccini può essere schematizzato come riportato in Figura 1.2:

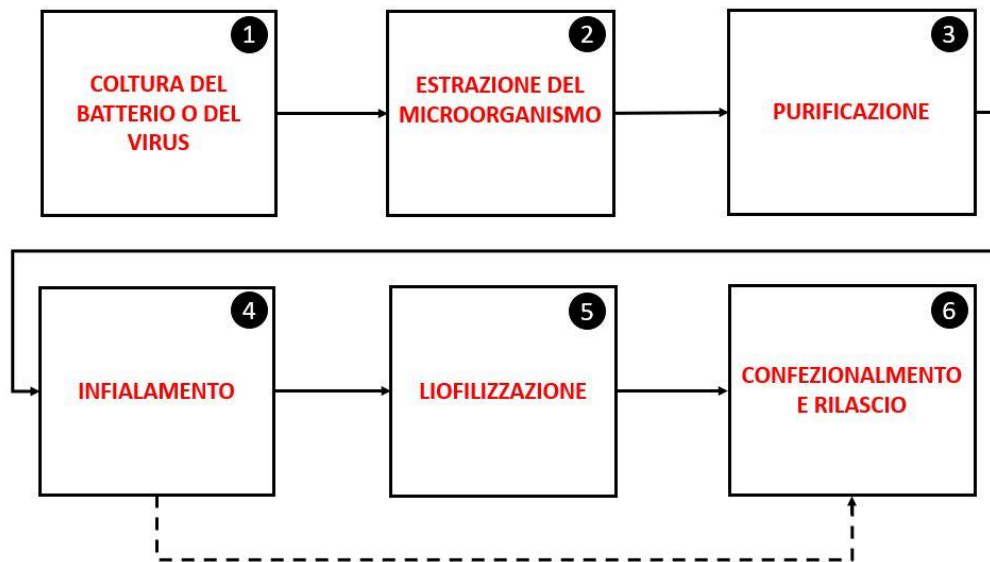


Figura 1.2 Fasi del processo di produzione dei vaccini, la linea tratteggiata è relativa al fatto che i vaccini non instabili in soluzione non subiscono la fase di liofilizzazione.

Il primo passo per la produzione di un vaccino è la generazione dell'antigene responsabile dell'innesco della risposta immunologica. A tale scopo, le proteine o il DNA dell'agente patogeno vengono coltivati e raccolti ad esempio attraverso uno dei seguenti meccanismi (Vaccines Europe, 2020):

- i virus vengono coltivati su cellule primarie (tipicamente cellule di embrioni di pollo) utilizzando uova fecondate o linee cellulari che si riproducono ripetutamente;
- i batteri vengono coltivati in bioreattori tramite specifici mezzi di coltura finalizzati all'ottimizzazione della produzione di antigeni;
- le proteine ricombinanti derivate dal patogeno possono essere generate in colture di lieviti, batteri o cellule.

La seconda fase riguarda l'isolamento dell'antigene dalle cellule, dalle proteine e dalle altre parti del mezzo di coltura che sono ancora presenti. Successivamente si procede alla purificazione dell'antigene per ottenere un prodotto di alta purezza e qualità; questo stadio può essere ottenuto per mezzo di differenti tecniche basate sulla dimensione delle proteine, le loro proprietà fisico-chimiche, la loro attività biologica o la loro affinità. Successivamente, il

materiale purificato o inattivato viene additivato con sostanze stabilizzanti (per prolungare la durata di conservazione) e adiuvanti (per migliorare la risposta immunitaria). Infine, tutte le sostanze vengono combinate e mescolate uniformemente in una siringa o un flacone che costituiscono il vaccino finale (fase quattro). Una volta che il vaccino è posto negli appositi recipienti, flaconi o siringhe, si procede, se richiesto dalle caratteristiche della sostanza attiva, alla rimozione del solvente, tipicamente acqua, tramite essiccamento affinché il prodotto si possa conservare più a lungo. In particolare, nel caso di sostanze termosensibili e instabili in soluzione acquosa, si attua un processo di liofilizzazione (fase cinque), che consiste nella rimozione del solvente tramite sublimazione a bassa pressione e temperatura. Questo metodo permette di ottenere un prodotto finale a basso tenore di umidità residua dotato di una struttura molto porosa che consente una rapida solubilizzazione nel momento di aggiungere la soluzione di ricostituzione per effettuare la vaccinazione. Tuttavia, il processo risulta molto costoso a causa dei bassi valori di pressione (vuoto) e temperatura richiesti. Terminata la fase di liofilizzazione, il prodotto presente nei flaconi viene sigillato con tappi sterili e si procede al confezionamento e al rilascio. Il processo descritto deve rispettare le norme GMP (*Good Manufacturing Practices*) che includono controlli di qualità, adeguate infrastrutture e separazione delle diverse attività per evitare la contaminazione del prodotto. I vaccini infine vengono adeguatamente etichettati e distribuiti (fase 6). Dal momento che, generalmente, i vaccini sono molto sensibili al calore, è previsto che la temperatura venga mantenuta tra i 2°C e gli 8 °C in ogni fase del processo, compresi lo stoccaggio finale ed il trasporto, sino al momento di utilizzo (catena del freddo). Vengono quindi utilizzate apparecchiature in grado di adattare la temperatura dei vaccini anche in funzione del clima del Paese di destinazione.

1.2 Il processo di liofilizzazione

Molti prodotti farmaceutici contengono ingredienti attivi che non sono stabili se sottoposti a lunghi periodi di tempo in soluzione acquosa. In presenza di acqua, come solvente o co-solvente, i materiali degradano attraverso una reazione di idrolisi o attraverso altre reazioni chimiche che mobilitano le molecole. Per trattare sostanze termolabili viene utilizzata la liofilizzazione che è un processo di essiccamento composto da tre fasi: congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario. La descrizione di ciascuna fase e dell'apparecchiatura di liofilizzazione è riportata nei paragrafi seguenti.

1.2.1 Apparecchiatura di liofilizzazione: caratteristiche generali

Il sistema di liofilizzazione è generalmente costituito da due camere principali: la camera di liofilizzazione e la camera di condensazione del vapore. In Figura 1.3 è rappresentato schematicamente un liofilizzatore.

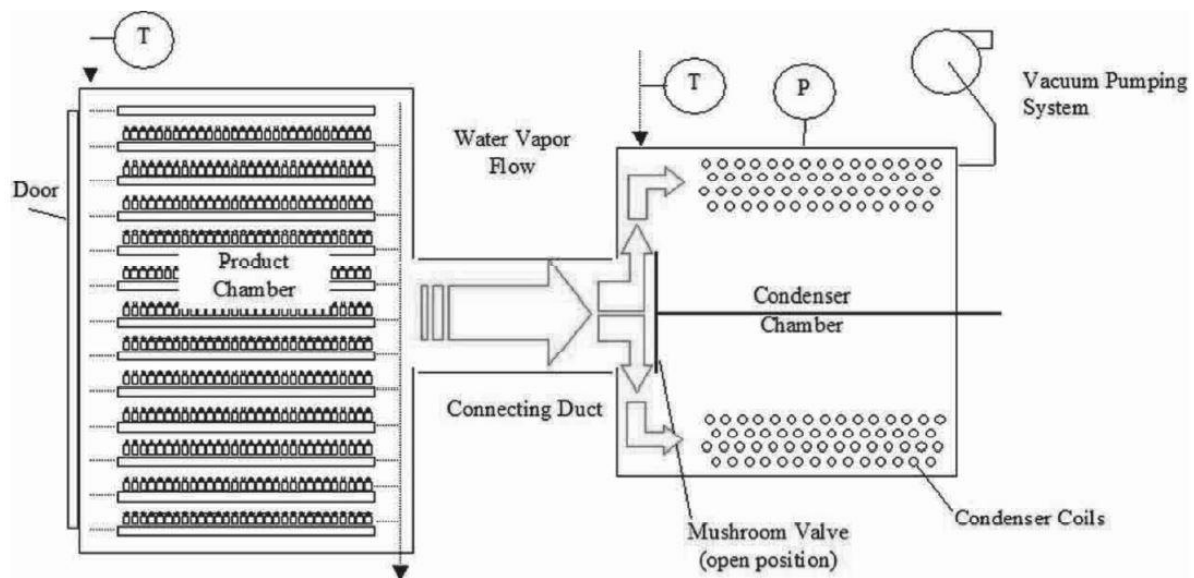


Figura 1.3 Rappresentazione schematica di un sistema di liofilizzazione (Alexeenko et al., 2010).

Oltre alle due camere, nel sistema di liofilizzazione sono presenti un sistema di controllo e monitoraggio, una pompa da vuoto e un sistema di riscaldamento-refrigerazione; quest'ultimo può essere costituito da uno o due cicli frigoriferi separati (Bruttini e Liapis, 2007).

La camera di liofilizzazione è costituita da vari ripiani o piastre (*shelves*) attraverso i quali fluisce il fluido di servizio, generalmente un olio diatermico. Il numero di piastre varia a seconda della scala di utilizzo e del modello utilizzato: in apparecchiature da laboratorio generalmente si collocano da 1 a 5 ripiani. In ciascun ripiano vengono caricati i flaconi contenenti la formulazione, che possono essere disposti a nido d'ape o raggruppati in file. Durante la sublimazione il vapore prodotto passa attraverso i canali di passaggio dei tappi dei flaconi, quindi il vapore d'acqua che si forma in camera attraversa un condotto collegato al condensatore, a sua volta raffreddato con gas refrigerante e si deposita su quest'ultimo sotto forma di ghiaccio. Il condensatore è collegato a una pompa da vuoto necessaria a creare il vuoto imposto durante la fase di essiccamento primario e secondario.

1.2.2 Fase 1: Congelamento

In questa fase la soluzione contenente il vaccino viene inserita in flaconi che vengono caricati sui ripiani della camera del liofilizzatore. I flaconi non sono completamente sigillati, ma sono dotati di tappi posizionati in maniera da permettere il passaggio di vapore nelle fasi successive del processo. La temperatura dell'olio diatermico che scorre nei ripiani (o piastre) posti nella camera del liofilizzatore viene diminuita, in dipendenza delle caratteristiche della formulazione del prodotto (ad esempio, la temperatura eutettica o di transizione vetrosa del concentrato congelato; tipicamente può arrivare a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). In questo modo la temperatura del prodotto presente nei flaconi diminuisce tramite conduzione termica fino al raggiungimento del punto di congelamento. La velocità di raffreddamento è un parametro chiave per la dimensione dei cristalli che si ottengono. Cristalli di piccole dimensioni, ottenuti generalmente ad alte velocità di raffreddamento, comportano un aumento della resistenza al flusso di vapore attraverso la pastiglia, con conseguente allungamento della durata della fase di essiccamento primario. Dall'altro lato, la fase di essiccamento secondario è più veloce in quanto il desorbimento dell'acqua, ancora presente nella pastiglia, è facilitato in pori di piccole dimensioni.

1.2.3 Fase 2: Essiccamento primario

Al termine della fase di congelamento la camera viene evacuata portando la pressione ad alti valori di vuoto (fino a 20 mT) tramite una pompa da vuoto. Raggiunta la pressione desiderata si procede con la fase di essiccamento primario (*primary drying*) che, come mostrato in Figura 1.4, copre il 70-80% della durata dell'intero processo ed è la più energivora di tutto il processo.

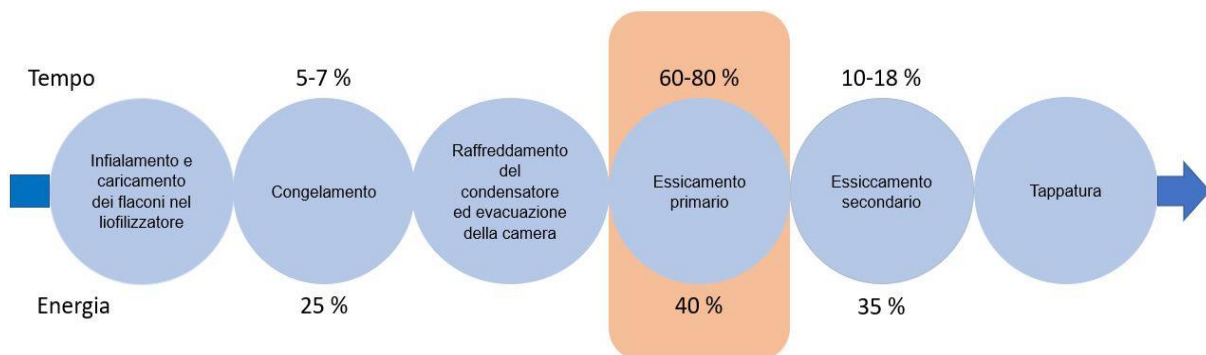


Figura 1.4 Rappresentazione schematica del processo di liofilizzazione in termini di tempo necessario per ogni fase e di energia richiesta. (modificata da Depaz et al. (2016)).

Durante questa fase il solvente ghiacciato viene rimosso dal prodotto, la temperatura dell'olio che fluisce nelle piastre viene aumentata ed il solvente inizia a sublimare. L'aumento di

temperatura è necessario in quanto il solo abbassamento della pressione in camera non è sufficiente a garantire l'attivazione del processo di sublimazione; si raggiungerebbe infatti una situazione di equilibrio tra la tensione di vapore e la pressione parziale di vapore acqueo in camera, con conseguente annullamento della forza motrice della sublimazione (ovviamente nel caso in cui la pressione in camera non sia inferiore alla pressione di equilibrio solido/vapore dell'acqua alla temperatura del prodotto).

La gestione ottimale della temperatura dell'olio diatermico e della pressione di camera è tuttavia vincolata dal rispetto delle condizioni seguenti:

- temperatura del prodotto: essa deve rimanere inferiore alla temperatura critica della formulazione (nel caso di prodotti amorfi il suo valore è di qualche grado superiore alla temperatura di transizione vetrosa (temperatura di collasso), mentre per i prodotti cristallini è prossimo al valore della temperatura eutettica. Il raggiungimento del valore limite causa la denaturazione, il cambiamento estetico o il collasso della pastiglia ottenuta, con conseguente impossibilità di successivo utilizzo. Questo problema riguarda in particolar modo i flaconi posti nella zona esterna del ripiano, in quanto maggiormente soggetti al contributo di trasferimento di calore per radiazione termica dovuto alla vicinanza delle pareti del liofilizzatore.
- capacità di condensazione: il vapore generato dalla sublimazione fluisce attraverso il condotto che unisce la camera del liofilizzatore al condensatore e solidifica sulla superficie fredda dello scambiatore, mantenuta a una temperatura di circa $-60/-80$ °C. All'inizio della fase di essiccamento primario può accadere che la velocità di sublimazione del vapore non sia compatibile con la capacità del condensatore, soprattutto a causa di una rapida sublimazione dai flaconi nella zona esterna. In questo caso, si incorre in un blocco del flusso di sublimazione nel condotto (*choked flow*) dovuto alla parziale condensazione del vapore totale generato; questo provoca un accumulo di vapore nella camera del liofilizzatore e alla conseguente perdita di controllo di pressione. Questo problema si presenta soprattutto in liofilizzatori in scala di laboratorio; in scala industriale, dove le dimensioni del condotto e del condensatore sono molto elevate, la capacità non è solitamente limitante.

Alla fine della fase di essiccamento primario non è più presente ghiaccio nel prodotto, ma solo acqua adsorbita nella pastiglia di solido secco; la rimozione (seppur parziale) di quest'acqua residua viene attuata nella fase di essiccamento secondario.

1.2.4 Fase 3: Essiccamento secondario

La fase di essiccamento secondario (*secondary drying*) permette di rimuovere l'acqua adsorbita nel solido al termine dell'essiccamento primario. In questa fase la temperatura dell'olio diatermico che fluisce nelle piastre viene aumentata solitamente fino alla massima temperatura per cui il prodotto è stabile (anche 40°C), mentre la pressione rimane tipicamente invariata rispetto alla fase precedente (Sadikoglu *et al.*, 1998). La temperatura viene quindi mantenuta costante fino al raggiungimento della quantità desiderata di umidità residua (tipicamente 1-3% w/w (Tang e Pikal, 2004)), al fine di assicurare la stabilità del prodotto finale.

Al termine di questa fase, il vapore rimasto in camera viene completamente rimosso e la camera viene alimentata con azoto per mantenere un ambiente inerte. La temperatura delle piastre viene quindi portata e mantenuta al valore di stoccaggio del prodotto finale; infine, viene azionato un pistone che spinge verso il basso le piastre per tappare i flaconi (*stoppering*).

1.3 Sistemi di misura

Al fine di ottenere il prodotto liofilizzato con le proprietà desiderate, è necessario un attento monitoraggio dell'andamento del processo, mediante appositi strumenti di misurazione installati nell'impianto di liofilizzazione. In particolare, le misure di temperatura del prodotto e la pressione della camera sono essenziali sia per stabilire il raggiungimento di un eventuale condizione critica per il prodotto o la morfologia della pastiglia liofilizzata (ad esempio il collasso §1.2.3) sia per monitorare il termine della fase di essiccamento primario.

1.3.1 Misure di temperatura

Le misure di temperatura sono utilizzate per evitare che:

- la temperatura del prodotto raggiunga la temperatura di collasso (pari a -34°C, qualora il formulato sia saccarosio, come in questo lavoro di Tesi, Gieseler *et al.*, 2007);
- la temperatura del prodotto sia troppo bassa, con conseguente aumento della durata della fase di essiccamento primario.

Per misurare la temperatura del prodotto negli esperimenti di seguito descritti è stata utilizzata una termocoppia a filo (tipologia T, rame/costantana, AWG 24) posizionata nel flacone, come rappresentato in Figura 1.5:

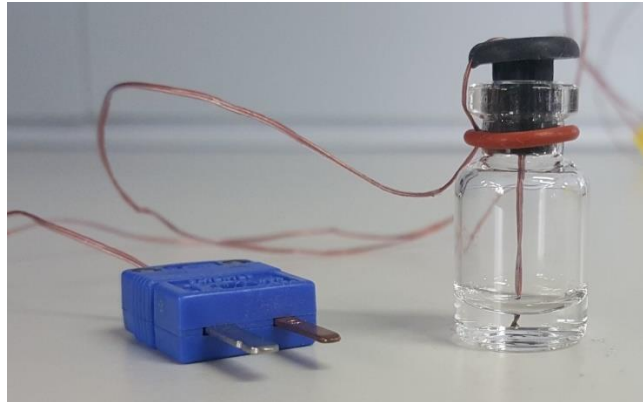


Figura 1.5 Rappresentazione di una termocoppia a filo inserita in un flacone

Al fine di ottenere dati affidabili è necessario che la termocoppia sia posizionata centralmente e a contatto con il vetro al fondo del flacone (Nail *et al.*, 2017). Data l'impossibilità di utilizzare una termocoppia per ogni flacone del vassoio, le termocoppie sono state collocate in posizioni chiave del vassoio (vedi Figura 3.2, sezioni colorate in azzurro) per poter monitorare il comportamento sia dei flaconi centrali (che sublimano più lentamente in quanto meno soggetti al contributo di calore dalle pareti) sia dei flaconi laterali (che presentano velocità di sublimazione maggiori dovuto al contributo di irraggiamento delle pareti).

Le termocoppie a filo presentano tuttavia dei limiti legati al loro utilizzo:

- la presenza della termocoppia nei flaconi favorisce la nucleazione del ghiaccio attorno al filo durante la fase di congelamento. Questo meccanismo porta a un incremento di velocità di sublimazione rispetto ai flaconi non monitorati, stimata pari a circa il 10% (Patel *et al.*, 2010);
- l'impossibilità di inserire la termocoppia in tutti i flaconi presenti nel liofilizzatore porta a una descrizione non del tutto rappresentativa della situazione reale poiché non è assicurato che flaconi posti nella stessa zona presentino il medesimo comportamento;
- i valori di temperatura misurati dalle termocoppie nel tempo sono utilizzabili solo fino a quando viene registrato un primo punto di flesso nel profilo temporale. Questo fenomeno è associabile a una brusca variazione del punto di contatto della sonda che si verifica quando parte del ghiaccio attorno alla termocoppia sublima (Patel *et al.*, 2010);
- la punta della termocoppia deve essere posizionata accuratamente e tale posizione deve essere mantenuta durante tutto il processo.

Si ricorda che per ovviare al problema di posizionamento e stabilità della termocoppia a filo è possibile utilizzare termocoppie *wireless* (che non necessitano quindi di fili esterni per trasmettere i dati, vedi Figura 1.6); tuttavia queste ultime, essendo di maggiori dimensioni (di conseguenza, più ingombranti) non sono state utilizzate in questo lavoro di Tesi.

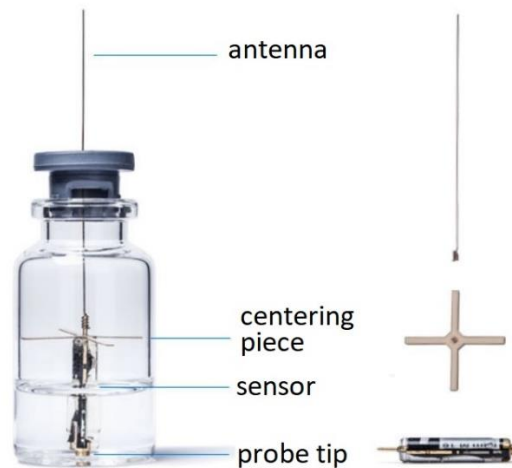


Figura 1.6 Rappresentazione di una termocoppia *wireless* inserita in un flacone (immagine acquisita da Tempris, 2020).

Le misure lette dalle termocoppie possono essere utilizzate anche per identificare, seppur in maniera approssimativa, la fine della fase di essiccamento primario. Prendendo in considerazione i valori misurati di temperatura di una termocoppia centrale, dove vi è una velocità di sublimazione più lenta rispetto alle altre zone, è possibile considerare il punto di flesso della termocoppia come indice per calcolare il tempo di fine primaria (Figura 1.7).

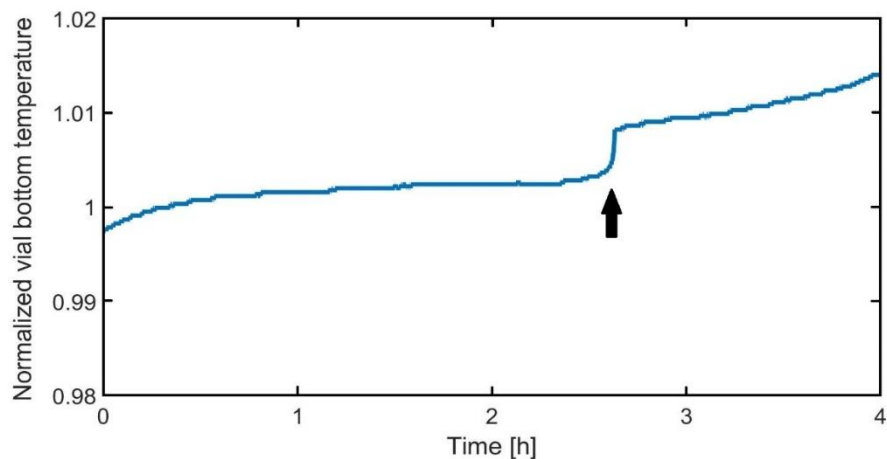


Figura 1.7 Esempio di profilo di temperatura di fondo flacone misurato da una termocoppia con identificazione del punto di flesso (freccia nera).

Nello specifico, la stima della fine del processo di essiccamento primario può essere ottenuta aggiungendo al tempo corrispondente al flesso una percentuale compresa tra il 10 ed il 20% del valore misurato; questo accorgimento è necessario per compensare la maggior velocità di sublimazione che si riscontra in flaconi con termocoppie rispetto al resto dei flaconi appartenenti alla medesima zona (Patel *et al.*, 2010).

1.3.2 Misure di pressione

Le misure di pressione rivestono un ruolo importante nell'identificazione sia della fine della fase di essiccamento primario sia dell'eventuale possibilità di incorrere nel flusso soffocato (§1.2.3).

La pressione della camera P_c viene misurata attraverso un manometro capacitivo; il principio di funzionamento è la contrapposizione di una forza elastica, esercitata dal diaframma, ad una forza di pressione (Figura 1.8).

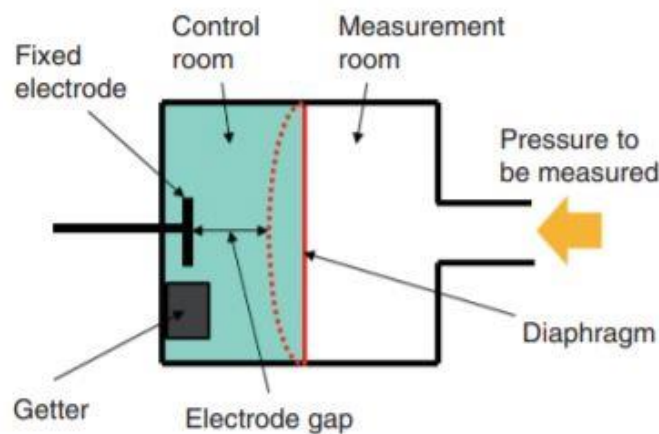


Figura 1.8 Rappresentazione schematica di un manometro capacitivo (acquisita da www.horiba.com).

Nello specifico, il manometro è costituito da due ambienti: uno sottovuoto di riferimento (*control room*) e uno esposto alla pressione che deve essere misurata (*measurement room*). Le due zone sono divise da un diaframma metallico che si deforma a seguito di variazioni di pressione rispetto al riferimento, con conseguente variazione della configurazione interna dello strumento di misura e quindi della capacità elettrica del sistema (funzione della posizione del diaframma). Questa variazione di capacità elettrica viene infine convertita in variazione di pressione.

A supporto del manometro capacitivo viene spesso utilizzato un sensore di vuoto Pirani che misura la pressione sulla base di variazioni di conduttività termica legate alla composizione di

gas in camera (Figura 1.9). Il sensore è composto da due fili elettrici percorsi da corrente posti in ambiente sottovuoto che vanno a costituire un ponte di Wheatstone. Un filamento viene tenuto a pressione e a composizione di gas costante (riferimento) mentre l'altro viene esposto all'ambiente di cui si vuole misurare la pressione. Qualora si verificassero variazioni nella composizione del gas, si assiste a una variazione della temperatura del filo conduttore esposto all'ambiente rispetto al riferimento, la quale viene convertita in valori di pressione parziale d'acqua.

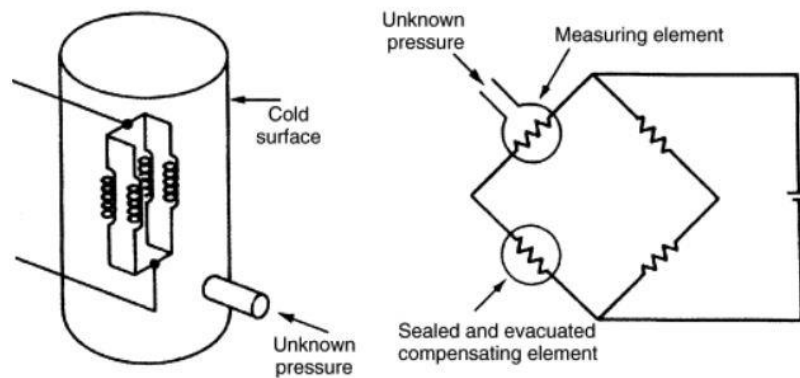


Figura 1.9 Rappresentazione schematica del sensore Pirani (immagine acquisita da Morris e Langari, 2015).

La differenza principale tra i due misuratori consiste nel fatto che il manometro capacitivo trasforma direttamente il segnale in valori di pressione della camera, mentre il sensore Pirani non misura direttamente la pressione effettiva di camera, ma fornisce informazioni in merito alla pressione parziale di acqua in camera e quindi all'andamento della fase di essiccamento primario. Questo metodo di misura è particolarmente adatto per il monitoraggio dei processi di liofilizzazione in quanto la composizione del gas in camera cambia durante il processo. Al procedere della fase di essiccamento primario, in camera vi è la presenza di vapore acqueo generato dalla sublimazione; quando essa volge al termine, invece, il vapore acqueo fluisce al condensatore e in camera rimane un ambiente inerte formato da azoto. Si precisa che le misure fornite dal Pirani sono circa il 60% più elevate delle misure ottenute dal capacitivo dato che la conduttività dell'acqua è circa 1.6 volte quella dell'azoto presente in camera (Patel *et al.*, 2010).

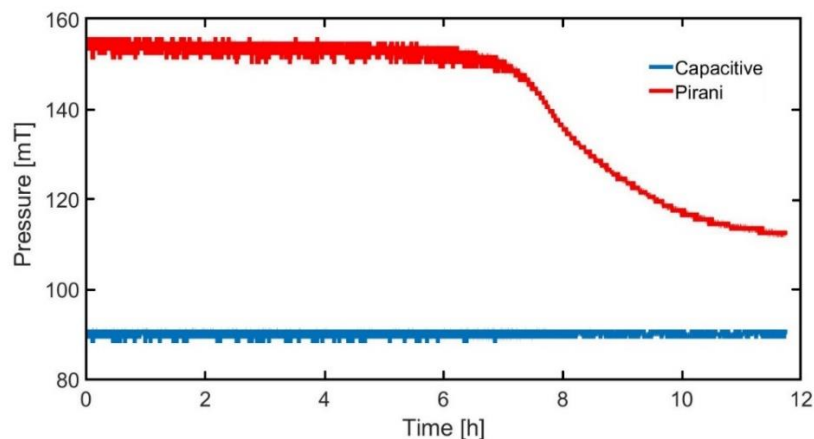


Figura 1.10 Esempio di un grafico di confronto tra i valori misurati da sensore Pirani (rosso) e dal manometro capacitivo (azzurro).

I due sensori di pressione sono utilizzati in parallelo per avere a disposizione, oltre ai valori delle termocoppie, un ulteriore strumento per la stima della durata della fase di essiccamento primario; infatti, nel momento in cui la differenza tra le misure fornite dal sensore Pirani e la pressione letta dal manometro capacitivo si avvicina a zero, significa che non è più presente vapore acqueo in camera ma solo azoto, in quanto tutta l'acqua sublimata è stata rimossa dalla camera e inviata al condensatore (vedi Figura 1.10). In questo caso, il metodo risulta essere conservativo in quanto la maggior parte dei flaconi ha raggiunto la fine della sublimazione quando la curva del Pirani inizia a decrescere (*onset*), mentre in corrispondenza alla sovrapposizione dei due profili la totalità dei flaconi ha completato il processo di sublimazione (*offset*).

Nel Capitolo 2 verranno presentati i modelli per la fase di essiccamento primario con descrizione delle equazioni che li governano e i vantaggi e i limiti di ciascun modello. Verrà presentata la tecnologia SMART implementata nel liofilizzatore in cui sono stati svolti gli esperimenti di questa Tesi, con riferimento alle equazioni che permettono la stima dei parametri ed il sistema di controllo interno che fornisce, al termine dell'esperimento, la ricetta ottimale per l'essiccamento primario.

1.4 Obiettivo della tesi

Generalmente lo sviluppo e il trasferimento di processi di liofilizzazione avvengono per via empirica, eseguendo numerosi esperimenti a differenti valori di temperatura delle piastre e di pressione di camera e valutando sperimentalmente la qualità del prodotto per ogni singolo caso. Questo approccio risulta tuttavia costoso, richiede tempo e non garantisce l'ottimizzazione del

protocollo al termine della campagna sperimentale. L'utilizzo di modelli matematici sta diventando sempre più diffuso nella pratica industriale poiché i modelli, una volta identificati, permettono di descrivere il sistema, di simularlo e di ottimizzarlo. Tuttavia, la loro identificazione necessita del minor numero possibile di prove sperimentali informative per la calibrazione, soprattutto su macchine di larga scala, e di un tempo di calcolo ragionevole. La qualità dell'informazione che si può ricavare dagli esperimenti dipende da come vengono impostate le condizioni sperimentali in termini di variabili manipolabili del sistema. La stima dei parametri che caratterizzano il modello è fondamentale, il loro valore deve essere il più accurato e preciso possibile e ciò richiede, oltre ad una profonda conoscenza del processo e dei fenomeni di trasferimento di massa e di calore che avvengono nel prodotto, l'esecuzione di esperimenti progettati *ad hoc*. Il modello identificato in tal modo può permettere di determinare lo spazio di progettazione e di studiare *in silico* l'evoluzione del prodotto in funzione delle condizioni operative.

In questa Tesi si intende confrontare tre diversi protocolli sperimentali per l'identificazione di modelli matematici a principi primi abili a descrivere la fase di essiccamento primario del processo di liofilizzazione. I risultati ottenuti dai modelli in termini di predizioni sulla temperatura del prodotto durante la sublimazione e tempo finale di essiccamento primario sono confrontati tra loro e convalidati con dati sperimentali. La convalida attraverso i dati sperimentali è fondamentale in questo senso; l'individuazione del tempo di sublimazione necessario, attraverso il modello, il più vicino possibile al tempo sperimentale permette di ottimizzare il processo e avere enormi vantaggi dal punto di vista economico essendo questa fase la più dispendiosa e la più durevole.

Capitolo 2

Modellazione della fase di essiccamento primario

L'essiccamento primario rappresenta la fase più lunga e più energivora di tutto il processo di liofilizzazione; la sua ottimizzazione è perciò cruciale per ridurre la durata totale del processo e aumentarne la produttività e la profittabilità. L'ottimizzazione di questa fase consiste nell'identificare la combinazione ottimale delle variabili manipolate (profili temporali della temperatura dell'olio siliconico e pressione della camera di liofilizzazione) che permette di completare la sublimazione in tutti i flaconi nel minor tempo possibile, rispettando i vincoli fisici imposti sulla temperatura massima accettabile per il prodotto e sul massimo flusso di sublimazione accettabile per la specifica apparecchiatura considerata (§1.2.3).

Per descrivere la fase di essiccamento primario del processo di liofilizzazione sono stati sviluppati diversi modelli matematici che si differenziano in base al grado di complessità legato al dettaglio descrittivo desiderato. In letteratura esistono modelli multidimensionali e monodimensionali: i primi sono complessi, coinvolgono un elevato numero di parametri e la loro applicazione è limitata dall'elevato costo computazionale (Liapis e Bruttini 1995, Pisano *et al.* 2011, Fissore *et al.*, 2015, Scutellà *et al.* 2017). Spesso la risoluzione di questo tipo di modelli prevede l'impiego della fluidodinamica computazionale (*Computational Fluid Dynamics*, CFD) utilizzata per avere una miglior comprensione della dinamica del flusso di sublimazione, per identificare differenze prestazionali nell'utilizzo di diverse apparecchiature (tipologia di condensatore, dimensioni camera di liofilizzazione) e per ottenere informazioni più approfondite sul processo al fine di migliorarne il *design* di concerto con il *design* dell'apparecchiatura (Ganguly *et al.* 2017, Sane *et al.* 2017)

I modelli monodimensionali, invece, nonostante siano basati su semplificazioni del fenomeno descritto, coprono un importante ruolo a livello industriale in quanto includono un minor numero di parametri con conseguente riduzione del costo computazionale. Esempi di quest'ultima tipologia di modelli sono stati proposti da Pikal 1985, Millman *et al.* 1985, Sadikoglu e Liapis 1997 e Velardi e Barresi, 2008. In questo capitolo vengono presentati: (i)

un modello pseudo-stazionario monodimensionale (Fissore *et al.* (2011)) e le relative equazioni costitutive; (ii) la tecnologia SMART, integrata nel liofilizzatore utilizzato per le prove sperimentali descritte in questa Tesi, con un breve accenno all'utilizzo dello stesso per la definizione in tempo reale del protocollo ottimale; (iii) un modello dinamico e le equazioni che lo governano, evidenziandone le differenze rispetto al modello pseudo-stazionario.

2.1 Il modello pseudo-stazionario

I modelli monodimensionali sono i modelli più semplici e meno onerosi dal punto di vista computazionale; la loro semplicità deriva dal fatto che non vengono considerati gradienti radiali di temperatura e eterogeneità all'interno del lotto. Essi si basano su equazioni di tipo algebrico e differenziale di primo ordine (*differential algebraic equations*, DAEs) che includono sia il bilancio di massa attraverso lo strato ghiacciato del prodotto sia il bilancio di energia attraverso il vetro del flacone. A questa categoria fa parte anche il modello pseudo-stazionario (Fissore *et al.*, 2011), utilizzato in questo lavoro di Tesi e descritto nei seguenti sottoparagrafi.

2.1.1 Le equazioni del modello pseudo-stazionario

Il modello è costituito dai bilanci di massa e di energia all'interno di un singolo flacone. Il prodotto nel flacone è riscaldato per mezzo dell'olio silconico che fluisce all'interno del ripiano (*shelf*) su cui è riposto, il quale genera un flusso di calore J_q (W m^{-2}) proporzionale alla forza motrice data dalla differenza tra la temperatura dell'olio T_f (K) e la temperatura del prodotto a fondo flacone T_b (K); secondo l'equazione (2.1):

$$J_q = K_v(T_f - T_b), \quad (2.1)$$

dove K_v ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$) è il coefficiente di trasferimento di calore tra la piastra e il prodotto a fondo flacone, determinato attraverso la seguente equazione (2.2):

$$K_v = c_1 + \frac{c_2 P_c}{1 + c_3 P_c}, \quad (2.2)$$

dove P_c (Pa) è la pressione della camera di liofilizzazione. I coefficienti c_1 ($\text{W K}^{-1} \text{m}^{-2}$), c_2 ($\text{W K}^{-1} \text{m}^{-2} \text{Pa}^{-1}$) e c_3 (Pa^{-1}) sono parametri ottenuti dai dati sperimentali e tengono conto rispettivamente della posizione del flacone nel vassoio, degli effetti radianti e conduttivi nel punto di contatto tra il flacone ed il vassoio e attraverso il gas intrappolato tra il fondo del flacone e la piastra e dell'effetto della pressione di camera.

Si assume che il flusso di materia generato dalla sublimazione sia direttamente proporzionale al flusso termico, tramite l'equazione (2.3):

$$J_w = \frac{J_q}{\Delta H_s}, \quad (2.3)$$

Il flusso di sublimazione J_w ($\text{kg s}^{-1}\text{m}^{-2}$) viene assunto proporzionale alla forza motrice data dalla differenza tra la pressione di vapore all'interfaccia di sublimazione $p_{w,i}$ (Pa) e la pressione della camera P_c (Pa), tramite la seguente espressione:

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{w,i} - P_c), \quad (2.4)$$

La pressione di vapore di acqua all'interfaccia $p_{w,i}$ è funzione della temperatura del prodotto e può essere calcolata secondo l'equazione (2.5), proposta da Goff e Gratch (1946), valida per temperature comprese tra -100 °C e 0 °C:

$$p_{w,i} = \exp\left(-\frac{6150.6}{T_i} + 28.932\right), \quad (2.5)$$

dove T_i (K) è la temperatura dell'interfaccia solido-vapore.

Il parametro R_p (m s^{-1}) rappresenta la resistenza al trasporto di massa durante la sublimazione e dipende dal metodo di congelamento, dal tipo di prodotto, dal liofilizzatore utilizzato e dallo spessore dello strato secco, secondo l'equazione (2.6):

$$R_p = R_0 + \frac{A L_{dried}}{1 + B L_{dried}}, \quad (2.6)$$

dove R_0 (m s^{-1}) rappresenta la resistenza al trasporto di massa all'inizio della fase di essiccamento primario e dipende dalla formulazione considerata. A (s^{-1}) e B (m^{-1}) sono invece parametri indicativi della variazione della resistenza al trasporto di massa al variare della lunghezza dello strato secco L_{dried} (m). Lo spessore del prodotto secco L_{dried} e del prodotto ghiacciato L_{frozen} sono relazionati dall'equazione seguente:

$$L_{dried} = L_0 - L_{frozen}, \quad (2.7)$$

dove L_0 (m) è lo spessore iniziale del prodotto ghiacciato, calcolato a partire dal volume iniziale di prodotto infialato nel flacone. La variazione dello spessore dello strato ghiacciato nel tempo può essere calcolata mediante l'equazione seguente:

$$\frac{dL_{frozen}}{dt} = - \frac{1}{\rho_{frozen} - \rho_{dried}} J_w, \quad (2.8)$$

dove ρ_{frozen} (kg m^3) è la densità del prodotto ghiacciato e ρ_{dried} (kg m^3) è la densità del prodotto secco. La relazione di chiusura del modello, che correla T_i e T_b , viene determinata con la seguente equazione, assumendo trascurabile l'accumulo di calore nello strato ghiacciato (flusso di calore costante):

$$T_b = T_f - \frac{1}{K_v} \left(\frac{1}{K_v} + \frac{L_{frozen}}{\lambda_{frozen}} \right)^{-1} (T_f - T_i), \quad (2.9)$$

dove λ_{frozen} ($\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$) rappresenta la conducibilità termica del prodotto ghiacciato.

È possibile calcolare infine la quantità totale di acqua sublimata dai flaconi M (kg) attraverso l'equazione (2.10):

$$M = \int_0^{t_{drying}} J_w \pi \frac{d_{in,vial}^2}{4} dt, \quad (2.10)$$

dove $d_{in,vial}$ (m) è il diametro interno del flacone.

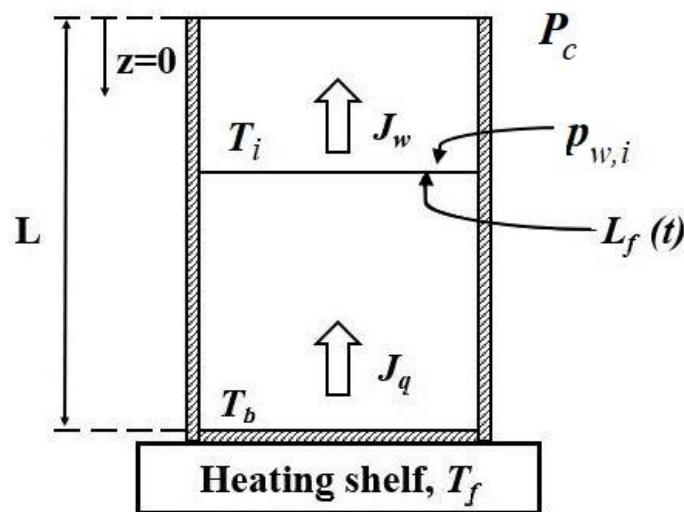


Figura 2.1 Sezione semplificata del flacone e rappresentazione schematica delle variabili di processo chiave implementate nel modello (modificata da Velardi et al. (2008)).

In sintesi, il modello pseudo-stazionario è composto da:

- un sistema DAE costituito da un'equazione differenziale e nove equazioni algebriche;
- una variabile di stato differenziale (L_{frozen}) e sette variabili di stato algebriche ($J_w, J_q, T_b, T_f, T_i, P_c, p_{w,i}$);
- quattro proprietà fisiche del sistema ($\rho_{frozen}, \rho_{dried}, \lambda_{frozen}, \Delta H_s$);
- sei parametri da stimare, in particolare tre inerenti la stima del parametro che descrive la resistenza al trasporto di massa R_p (R_0, A, B) e tre relativi al trasferimento di calore K_v (c_1, c_2, c_3).

Le variabili chiave del modello vengono rappresentate schematicamente in Figura 2.1.

2.1.2 Assunzioni, vantaggi e limiti del modello pseudo-stazionario

Il modello proposto da Fissore *et al.* (2011) si basa su diverse assunzioni:

- la pressione parziale dell'acqua in camera è assunta uguale alla pressione di camera in quanto vige l'ipotesi che l'unico contributo alla variazione di pressione in camera sia dato dalla sublimazione del vapore dai flaconi ($p_{w,c} = P_c$);
- la condizione di pseudo-stazionarietà è giustificata dalla lenta dinamica del processo e dall'operare il processo a condizioni di esercizio (set point di temperatura e pressione) costanti nel tempo;
- il flusso di calore J_q riportato in equazione (2.1) è l'unico contributo di trasferimento di calore per il riscaldamento del prodotto nei flaconi ed è assunto costante (non vi è accumulo di calore nello strato ghiacciato);
- la variabile T_i è considerata uguale a T_b . Questa assunzione è legittima per prodotti farmaceutici processati in unità di liofilizzazione, in quanto il trasferimento di calore attraverso lo strato ghiacciato è più rapido di quello tra ripiani e fondo flacone (Mortier *et al.*, 2016). La temperatura del prodotto, in questo modello, è considerata pari alla temperatura di fondo flacone, che risulta essere la più alta possibile, in quanto non vi è accumulo di calore all'interfaccia.
- la temperatura del fluido riscaldante T_f è assunta costante e coincidente con la temperatura della superficie della piastra (escludendo la rampa tra la temperatura finale della fase di congelamento e la temperatura di essiccamento primario).

Il modello presenta i seguenti vantaggi: (i) utilizzo di un numero limitato di parametri; (ii) numero ridotto di equazioni costitutive; (iii) basso costo computazionale. Tuttavia, l'utilizzo di un modello pseudo-stazionario mono-flacone è soggetto a diverse limitazioni:

- non include la descrizione dell'eterogeneità dell'essiccamento all'interno del lotto. I flaconi posti in diverse posizioni nella camera di liofilizzazione presentano infatti velocità di sublimazione e profili di temperatura differenti, dovuti prevalentemente a contributi di irraggiamento (dalle pareti della camera) che impattano in maniera eterogenea sul flusso di calore totale fornito al prodotto ghiacciato. Per ovviare a questo problema, l'approccio tipico consiste nel calibrare il modello separatamente per i flaconi centrali e per quelli perimetrali. La simulazione e l'ottimizzazione basata sul modello viene quindi effettuata ipotizzando che tutti i flaconi del lotto si comportino come quelli centrali (nella maggior parte delle situazioni; Fissore et al., 2011) o come quelli perimetrali. Chiaramente, la ricetta ottimale ottenuta assumendo che tutti i flaconi del lotto si comportino come quelli perimetrali consente di soddisfare i vincoli sulla temperatura del prodotto e sul flusso di sublimazione, a discapito della rappresentatività della simulazione, per la durata effettiva della sublimazione, per tutti i flaconi. D'altra parte, l'ipotesi che tutti i flaconi del lotto si comportino come flaconi centrali dà risultati ottimali in termini di durata dell'essiccamento primario, ma il protocollo risultante può non garantire la qualità richiesta del prodotto nei flaconi di bordo a causa di una potenziale violazione dei vincoli. L'utilizzo di questo modello comporta pertanto una scelta tra queste due ipotesi tramite il confronto tra il risparmio energetico derivante da un tempo di asciugatura più breve con il rischio di rigetto di prodotto dovuto ai flaconi laterali;
- l'assunzione di pseudo-stazionarietà non permette di descrivere la dinamica reale della temperatura del prodotto qualora la temperatura del vassoio venga manipolata durante il processo. Questa assunzione è molto restrittiva, in quanto limitare la variazione di T_f e P_c nel tempo riduce la possibilità di ottenere protocolli ottimali in termini di durata del processo;
- la pressione di camera sostenuta solamente dal vapore prodotto dalla sublimazione dei flaconi è ragionevole solo se la camera del liofilizzatore è completamente caricata di flaconi in tutti i vassoi e l'assunzione decade nella fasi finali della sublimazione.

2.2 La tecnologia SMART

La tecnologia SMART è uno strumento innovativo associato al liofilizzatore Lyostar3 (SP Scientific, Stone Ridge, NY, USA) utilizzato per gli esperimenti della presente Tesi, che permette di automatizzare un ciclo di liofilizzazione senza dover impostare a priori un dato protocollo. Rispetto al liofilizzatore classico, questo tipo di liofilizzatore include una componente hardware e software che analizza i dati misurati (pressione della camera e temperatura del prodotto) al fine di implementare la ricetta ottimale per il dato prodotto considerato. Questo avviene attraverso la stima in linea dei coefficienti di trasferimento di calore e materia, che vengono poi utilizzati per il calcolo di valori ottimali delle variabili manipolate.

Per determinare la temperatura del prodotto durante l'essiccamento primario, il metodo utilizza misure di temperatura manometrica (MTM) ottenute da prove non invasive di aumento di pressione (*pressure rise test, PRT*) per determinare i parametri critici del prodotto e del processo. Questa metodologia consiste nel chiudere la valvola che connette la camera di liofilizzazione e il condensatore per un periodo di tempo limitato (circa 15 secondi) ad intervalli di circa un'ora nel corso dell'esperimento. Durante questa perturbazione la pressione in camera aumenta rapidamente a causa della continua sublimazione del ghiaccio e i dati di pressione ottenuti vengono raccolti in funzione del tempo. La pressione della camera $P(t)$ è espressa attraverso le misure MTM, secondo l'equazione (2.11), come riportato da Pikal *et al.* (2005):

$$\begin{aligned}
 P(t) = & \underbrace{P_{ice} - (P_{ice} - P_0) \exp \left[- \left(\frac{3.461N \cdot A_p \cdot T_s}{V_c(\hat{R}_p + \hat{R}_s)} \right) t \right]}_{\text{Termine 1}} \quad \text{Termine 3} \\
 & + \underbrace{0.0465 P_{ice} \Delta T \left[1 - 0.811 \exp \left(- \frac{0.114}{L_{frozen}} \right) \right]}_{\text{Termine 2}} + \underbrace{Xt}_{\text{Termine 3}}
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

dove P_{ice} (Torr) è la pressione di vapore del ghiaccio all'interfaccia di sublimazione e viene determinata tramite regressione dei dati ottenuti con i test di aumento di pressione, mentre P_0 (Torr) è la pressione iniziale della camera; L_{frozen} (cm) è lo spessore del prodotto ghiacciato, N è il numero di flaconi caricati, A_p (cm²) è l'area interna della sezione trasversale del flacone,

T_s (K) è la temperatura del vassoio impostata e V_c (L) è il volume della camera di liofilizzazione. Il contributo $(\hat{R}_p + \hat{R}_s)$, ottenuto tramite regressione dei dati sperimentali contiene, rispettivamente, la resistenza al trasporto di massa attraverso il prodotto e attraverso il tappo del flacone (*stopper*). La resistenza dovuta ai tappi \hat{R}_s non viene generalmente considerato poiché è un valore trascurabile rispetto la resistenza del prodotto (Tang *et al.*, 2005).

Il termine X (Torr s⁻¹) è un coefficiente di regressione che include fenomeni che avvengono durante la chiusura della valvola, quali: (i) l'aumento di pressione dovuto al deadsorbimento dell'acqua; (ii) il tasso di perdita di tenuta (*leak rate*); (iii) l'aumento di pressione dovuto all'aumento di temperatura del ghiaccio. Si precisa che questi ultimi due contributi sono generalmente trascurabili alla fine della fase di essiccamento primario in quanto il tasso di perdita di tenuta è minore di 1/25 mTorr s⁻¹ (Tang *et al.* 2005) e l'aumento di temperatura del ghiaccio è circa zero (prodotto secco); pertanto, il valore di X ottenuto al termine dell'essiccamento primario è dovuto quasi interamente al deadsorbimento dell'acqua dal prodotto secco.

Il termine ΔT presente nell'equazione (2.11) è la differenza di temperatura tra l'interfaccia di sublimazione del ghiaccio e il fondo flacone e può essere fissato a priori o determinato utilizzando l'equazione (2.12), riportata da Tang *et al.* (2006):

$$\Delta T = \frac{\left[\frac{24.7L_{frozen}(P_{ice} - P_0)}{(\hat{R}_p + \hat{R}_s)} - 0.0102L_{frozen}(T_s - T_p) \right]}{1 - 0.0102L_{frozen}}, \quad (2.12)$$

dove T_p (K) è la temperatura del prodotto all'interfaccia di sublimazione, determinata tramite l'equazione (2.13):

$$\ln(P_{ice}) = \frac{-6144.96}{T_p} + 24.01849, \quad (2.13)$$

Si precisa che l'equazione MTM (2.11) descrive tre contributi:

- l'aumento di pressione controllato dalla resistenza dello strato secco (termine 1);
- l'aumento di pressione causato dall'aumento di temperatura alla superficie di sublimazione (dovuto alla dissipazione dei gradienti di temperatura nello strato ghiacciato, termine 2);
- l'aumento di pressione dovuto all'aumento della temperatura del prodotto ghiacciato, dato dal trasferimento di calore dal vassoio al flacone (termine 3).

La combinazione delle equazioni (2.11- 2.13) permette di calcolare la temperatura del prodotto T_p , noto il valore di L_{frozen} nel tempo, il quale è calcolato tramite l'equazione seguente:

$$L_{frozen}(t) = \frac{m_0 - m(t)}{\rho_i A_p \varepsilon}, \quad (2.14)$$

dove m_0 è la massa iniziale di acqua nel flacone (g per flacone), ρ_i (g cm^{-3}) è la densità del ghiaccio, ε è la frazione volumetrica di ghiaccio ed è un valore costante nel tempo pari a 0.94 (per formulati a base saccarosio) e $m(t)$ è la massa di ghiaccio sublimato al tempo t (g per flacone), calcolata integrando la seguente equazione differenziale:

$$\frac{dm}{dt} = A_p \frac{P_{ice} - P_c}{(\hat{R}_p + \hat{R}_s)}, \quad (2.15)$$

dove dm/dt è la velocità di sublimazione del ghiaccio ($\text{g h}^{-1} \text{flacone}^{-1}$).

L'impostazione della temperatura *target* del prodotto è un punto delicato in quanto si devono considerare diversi aspetti.

In primo luogo, la temperatura *target* deve essere impostata a un valore inferiore a quello della temperatura di collasso, includendo un margine di sicurezza tale da non impattare sulla durata del processo; la tecnologia SMART prevede, come regola generale, che il margine di sicurezza sia impostato pari a: (i) 2 °C se il tempo di essiccamento primario stimato è superiore alle 50 h; (ii) 5°C se il tempo stimato è minore delle 8 h (Tang *et al.*, 2006).

In secondo luogo, è importante considerare anche l'eventualità di incorrere in velocità di trasferimento di calore e massa troppo elevate che possono causare la perdita di controllo della pressione in camera e della temperatura del condensatore. Il sovraccarico nel liofilizzatore è causato dalle dimensioni ridotte del condotto che collega la camera di liofilizzazione e il condensatore, da cui consegue la riduzione di capacità di rimuovere il vapore da parte del condensatore. Questo problema può essere evitato riducendo ulteriormente il valore della temperatura *target* del prodotto.

In pratica, la temperatura *target* $T_{p,target}$ è calcolata correggendo di una quantità β_{corr} (generalmente posta uguale a 1-2 °C). la temperatura del prodotto corrispondente al sovraccarico del liofilizzatore ($T_{p,overload}$), secondo la seguente equazione:

$$\begin{aligned}
T_{p,target} &= T_{p,overload} - \beta_{corr} \\
&= T_s + \frac{1}{A_v} \frac{dQ}{dt} \Big|_{overload} \left(\frac{1}{K_v} + \frac{L_{frozen}}{K_l} \right) - \beta_{corr},
\end{aligned} \tag{2.16}$$

In questa equazione il termine $\frac{dQ}{dt} \Big|_{overload}$ rappresenta il flusso termico che porta al sovraccarico della camera di liofilizzazione e viene valutato ad ogni PRT, mentre K_v e K_l sono, rispettivamente, il coefficiente di trasferimento di calore e la conduttività termica del ghiaccio (costante e pari a 20.52 [cal h⁻¹cm⁻²K⁻¹]). Il valore di K_v è calcolato tramite l'equazione seguente:

$$\Delta H_s \frac{dm}{dt} = A_v K_v (T_s - T_b), \tag{2.17}$$

Dove ΔH_s è l'entalpia di sublimazione del ghiaccio (cal g⁻¹) e T_b (K) è la temperatura di fondo flacone. Da notare che nelle Eqs. (2.16-2.17) si è implicitamente assunto che tutto il calore consumato dalla sublimazione del ghiaccio sia fornito dall'olio siliconico che fluisce nel vassoio.

Il software infine, confrontando il valore di $T_{p,target}$ e di T_p , manipola il valore di T_s attraverso un controllo automatico non esplicitamente documentato nel manuale con lo scopo di portare il valore di T_p al valore *target*. Il confronto tra le due temperature è effettuato ad ogni PRT, i quali sono eseguiti ad una frequenza di circa un'ora.

Il calcolo di $T_{p,target}$ permette inoltre di manipolare la pressione di camera per raggiungere la pressione di camera ottimale $P_{c,opt}$, calcolata attraverso l'equazione (2.18):

$$P_{c,opt} = 0.29 \cdot 10^{(0.0191 - T_{p,target})}, \tag{2.18}$$

Nella fase di impostazione della pressione della camera ottimale si deve comunque tenere in considerazione che essa deve essere molto inferiore alla pressione di vapore del ghiaccio, ma allo stesso tempo sufficientemente alta da minimizzare l'eterogeneità del trasferimento del calore nella camera del liofilizzatore che avviene a condizioni di vuoto spinto. La tecnologia SMART consente infine di individuare in maniera automatica il tempo necessario a completare la fase di essiccamento primario, tramite la valutazione della differenza tra la pressione di vapore del ghiaccio all'interfaccia (determinata da MTM) e la pressione della camera. Quando la differenza tra la pressione di vapore del ghiaccio all'interfaccia (P_{ice}) e la pressione della camera (P_c) è inferiore a 5 mT l'essiccamento primario ha termine (non vi è più la presenza di

ghiaccio). Il tempo stimato con questo approccio ha il vantaggio di essere rappresentativo del lotto nel suo insieme e non richiede l'utilizzo di termocoppie inserite nei flaconi del prodotto. Si noti che l'implementazione delle azioni di manipolazione delle variabili e di valutazione del tempo stimato dalla tecnologia SMART sono fuori dallo scopo di questa Tesi, per la quale la tecnologia SMART è stata utilizzata allo scopo principale di ottenere stime in linea dei parametri di trasferimento di massa e di calore del modello utilizzato.

La procedura MTM può essere modificata e utilizzata per ottimizzare anche la fase di essiccamento secondario, determinando la velocità di deadsorbimento dell'acqua e identificando il tempo necessario per terminare questa fase (Tang *et al.*, 2004).

Rispetto alla modellazione classica, la tecnologia SMART presenta dei vantaggi quali:

- l'identificazione della ricetta tramite tecnologia SMART non necessita di prove sperimentali preliminari. La modellazione classica, invece, richiede la conduzione di esperimenti sia per la calibrazione sia per la convalida;
- non richiede conoscenze dettagliate del processo, ma esegue l'ottimizzazione tramite il sistema di controllo interno basato su misure *online*.

Per quanto riguarda le limitazioni nell'utilizzo di questa metodologia, si evidenzia che (Tang *et al.* (2004)):

- il metodo SMART non garantisce la stabilità del prodotto;
- la semplicità della procedura della tecnologia SMART non è progettata per problemi di cristallizzazione complessi;
- sperimentalmente è stato osservato che, in caso di soluzioni amorfe molto concentrate (>20%), la procedura MTM funziona correttamente solo all'inizio della fase di essiccamento primario e per questo motivo è necessario utilizzare le misure di temperatura lette dalle termocoppie nella fase intermedia e finale.
- la temperatura misurata è una media della temperatura dei flaconi interni, pertanto non viene discriminata l'eterogeneità del lotto. Tuttavia, per ovviare all'eventualità che i flaconi esterni possano raggiungere la temperatura di collasso, viene utilizzato il margine di sicurezza sulla temperatura del prodotto presentato in Eq. (2.13);
- per ottenere risultati accurati deve essere garantita un'area di sublimazione minima, in quanto è stato riscontrato che una bassa area di sublimazione (quindi un basso numero di flaconi utilizzati) porta ad una differenza significativa tra la temperatura di prodotto misurata dal metodo MTM e la temperatura di prodotto letta dalle termocoppie, la quale

aumenta ulteriormente all'aumentare del numero di PRT. Sperimentalmente, è stato calcolato il rapporto tra l'area di sublimazione minima necessaria e il volume effettivo di camera del liofilizzatore che risulta essere di 2.9.

2.3. Modello dinamico

Il modello dinamico considerato ha un grado di dettaglio maggiore del modello pseudo-stazionario e permette di descrivere con maggior precisione i fenomeni fisici che prendono parte alla fase di essiccamento primario e che influiscono sulla sublimazione del prodotto. Il bilancio di energia, rappresentato in equazione (2.19), assume una forma differenziale e include contributi termici aggiuntivi rispetto al modello pseudo-stazionario:

$$\rho_{frozen} c_{p,frozen} A_v \frac{d(L_{frozen} T_b)}{dt} = Q_{w,v} + Q_{r,v} + Q_{s,v} - \Delta H_s J_w A_v, \quad (2.19)$$

dove $c_{p,frozen}$ ($J \text{ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$) è la capacità termica del prodotto ghiacciato. $Q_{w,v}$ (W), $Q_{r,v}$ (W) e $Q_{s,v}$ (W) rappresentano rispettivamente: la portata di calore dalle pareti della camera (*wall*) del liofilizzatore al flacone, la portata di calore dato dalle cornici (*rail*) su cui sono appoggiati i vassoi e la somma di portate di calore rispettivamente dalla piastra sopra e sotto al vassoio considerato (*shelf*). Il termine $Q_{w,v}$ (W) è puro contributo di irraggiamento dalle pareti della camera ed è descritto dall'equazione semplificata della legge di Stefan-Boltzmann (2.20) (Scutellà *et al.* 2017):

$$Q_{w,v} = a_1 \sigma_{sb} (T_w^4 - T_b^4), \quad (2.20)$$

dove a_1 (m^2) è un parametro che dipende dall'apparecchiatura ed è stimato dai dati sperimentali, σ_{sb} ($\text{W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$) è la costante di Stefan-Boltzmann e T_w (K) è la temperatura media delle pareti della camera. L'indicatore a_1 può essere interpretato come il prodotto tra l'emissività delle pareti e l'area laterale del flacone direttamente esposta all'irraggiamento. Analogamente, il termine $Q_{r,v}$ (W) è descritto come:

$$Q_{r,v} = a_2 \sigma_{sb} (T_r^4 - T_b^4), \quad (2.21)$$

Come a_1 , anche a_2 (m^2) è un parametro dipendente dall'apparecchiatura che viene stimato dai dati sperimentali, mentre T_r rappresenta la temperatura media della cornice. Infine, il termine $Q_{s,v}$ (W) racchiude sia il meccanismo di conduzione sia quello di irraggiamento (vedi Figura 2.2) ed è descritto matematicamente dall'equazione (2.22):

$$Q_{s,v} = (K_{sv} + K_3)A_v(T_f - T_b), \quad (2.22)$$

dove K_{sv} ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$) è una grandezza, dipendente dal valore di pressione della camera, che racchiude il contributo di trasferimento di calore legato alla conduzione diretta che avviene nel punto di contatto tra il vassoio ed il flacone e attraverso il gas intrappolato nel fondo del flacone; per questa ragione K_{sv} è descritto in maniera equivalente alla variabile K_v , riportata in equazione (2.2).

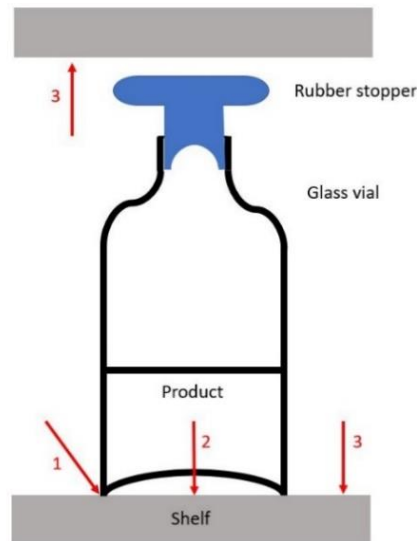


Figura 2.2 Meccanismi di trasferimento del calore durante la fase di essiccamento primario: (1) conduzione diretta della piastra al punto di contatto con il flacone; (2) conduzione attraverso il gas intrappolato tra il vassoio e il fondo del flacone; (3) irraggiamento dalla parete della piastra.

Il termine K_3 ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$) rappresenta invece il termine di irraggiamento dovuto alla piastra collocata sopra e sotto al vassoio su cui si trovano i flaconi, ed è definito come:

$$K_3 = a_3 \sigma_{sb} (T_f + T_b) (T_f^2 + T_b^2), \quad (2.23)$$

dove a_3 (-) quantifica il contributo dell'irraggiamento dalla piastra al fondo del flacone. Il modello include infine la dinamica della pressione parziale dell'acqua in camera, descritta dall'equazione (2.24), proposta da Scutellà *et al.* (2018):

$$\frac{dp_{w,c}}{dt} = \frac{R_g T_c}{V_c M_w} \left(\sum_{i=1}^{N_{vials}} \dot{m}_{sub} - \dot{m}_{cd} \right), \quad (2.24)$$

dove R_g ($\text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$) è la costante universale dei gas, T_c (K) e V_c (m^3) sono rispettivamente la temperatura ed il volume della camera del liofilizzatore, M_w (kg mol^{-1}) è il peso molecolare dell'acqua, N_{vials} è il numero di flaconi caricati nel vassoio, \dot{m}_{sub} (kg s^{-1}) è la portata massiva di sublimazione, mentre \dot{m}_{cd} (kg s^{-1}) è la portata di vapore che fluisce dalla camera al condensatore. Il termine \dot{m}_{cd} è calcolato utilizzando l'equazione proposta da Trelea *et al.* (2015):

$$\dot{m}_{cd} = \frac{1}{\alpha T_{cd}} \log \frac{P_c - p_{w,cd}}{P_c - p_{w,c}}, \quad (2.25)$$

dove T_{cd} (K) è la temperatura della camera di condensazione, α ($\text{Pa s kg}^{-1} \text{K}^{-1}$) è un parametro da stimare che ingloba i termini geometrici del condotto (area della sezione di passaggio e lunghezza effettiva) e $p_{w,cd}$ (Pa) rappresenta la pressione di equilibrio solido-vapore al condensatore.

Il vantaggio dell'utilizzo del modello dinamico è la possibilità di simulare zone differenti nel liofilizzatore, in quanto il termine \dot{m}_{sub} può essere espresso come sommatoria di più termini secondo l'equazione seguente:

$$\dot{m}_{sub} = \sum_{i=1}^{Nzone} \dot{m}_{sub,i}, \quad (2.26)$$

dove $\dot{m}_{sub,i}$ è la portata massiva di sublimazione della specifica zona e viene calcolata mediante l'equazione (2.27):

$$\dot{m}_{sub,i} = x_i N_{vials} J_{w,i} \frac{\pi d_{in,vial}^2}{4}, \quad (2.27)$$

dove x_i è la frazione di flaconi appartenenti alla zona i .

Il modello dinamico è quindi costituito da:

- le equazioni del modello pseudo-stazionario per quanto riguarda il bilancio di massa;
- un bilancio di energia che comprende la dinamica della temperatura di fondo flacone e i contributi termici aggiuntivi $Q_{w,v}$, $Q_{r,v}$ e $Q_{s,v}$;
- un'equazione addizionale per descrivere la dinamica della pressione parziale di acqua nella camera di sublimazione (Eq. 2.24);

- un flusso di sublimazione definito in modo differente rispetto a Eq. (2.4) in quanto la pressione parziale di acqua in camera non viene più assunta pari alla pressione di camera:

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{w,i} - p_{w,c}), \quad (2.28)$$

- una diversa formulazione per rappresentare il flusso di calore, in cui sono resi espliciti i contributi di irraggiamento, assunto pari a:

$$J_q = Q_{w,v} + Q_{r,v} + Q_{s,v}. \quad (2.29)$$

In definitiva il modello presenta:

- un sistema DAE composto da 3 equazioni differenziali e 15 equazioni algebriche;
- tre variabili di stato differenziali ($L_{frozen}, T_b, p_{w,c}$) e quindici variabili di stato algebriche ($J_w, J_q, T_f, T_i, P_c, p_{w,i}, T_w, T_r, T_c, Q_{w,v}, Q_{r,v}, Q_{s,v}, \dot{m}_{sub}, \dot{m}_{cd}, p_{w,cd}$);
- sei proprietà termodinamiche ($\rho_{frozen}, \rho_{dried}, \lambda_{frozen}, \Delta H_s, c_{p,frozen}, M_w$);
- nove parametri da stimare per ogni zona implementata: tre inerenti alla stima del parametro che descrive la resistenza al trasporto di massa R_p (R_0, A, B), tre relativi al trasferimento di calore K_v (c_1, c_2, c_3), tre nella descrizione dei contributi energetici di irraggiamento (a_1, a_2, a_3) e uno relativo al condensatore (α).

Capitolo 3

Prove sperimentali, stima parametrica e confronto tra i metodi

In questo capitolo vengono presentate le prove sperimentali, condotte sulla base dei tre differenti approcci descritti nelle sezioni precedenti, e condotte con lo scopo di identificare modelli matematici del processo di essiccamento primario. In primo luogo, si presenta l'apparecchiatura utilizzata in questo studio, le variabili misurate e i sistemi di misurazione utilizzati. Successivamente, si descrivono le procedure implementate per ottenere: (i) l'identificazione del modello pseudo-stazionario (tramite prove gravimetriche e misurazioni della temperatura del prodotto da termocoppie); (ii) l'identificazione del modello con tecnologia SMART; (iii) l'identificazione del modello dinamico, tramite progettazione di esperimenti ottimali sulla base del modello (MBDoE). Infine, si procede al confronto delle stime parametriche ottenute in fase di calibrazione e alla validazione dei modelli utilizzati nei tre casi, in modo da individuare il modello più accurato unitamente all'approccio che ne permette l'identificazione in maniera più rapida e meno onerosa in termini di prove sperimentali richieste.

3.1 Set-up sperimentale

Come anticipato nel Capitolo 1, in questo studio il processo di liofilizzazione è stato condotto in flaconi non siliconati da 3 mL infialati con 0.6 mL di una soluzione di saccarosio al 5% w/w (placebo), a cui corrisponde un'altezza di strato ghiacciato iniziale di 3.609 mm.



Figura 3.1 Fotografia del liofilizzatore Lyostar 3.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in un liofilizzatore Lyostar3 (SP Scientific, Stone Ridge, NY, USA). La camera di liofilizzazione è dotata di quattro vassoi, dei quali uno solo è stato caricato con flaconi (secondo ripiano, *partial loading*). La disposizione dei flaconi su ciascun vassoio è a nido d'ape (16 flaconi per 35 file, per un totale di 560 flaconi a vassoio), come rappresentato in Figura 3.2.

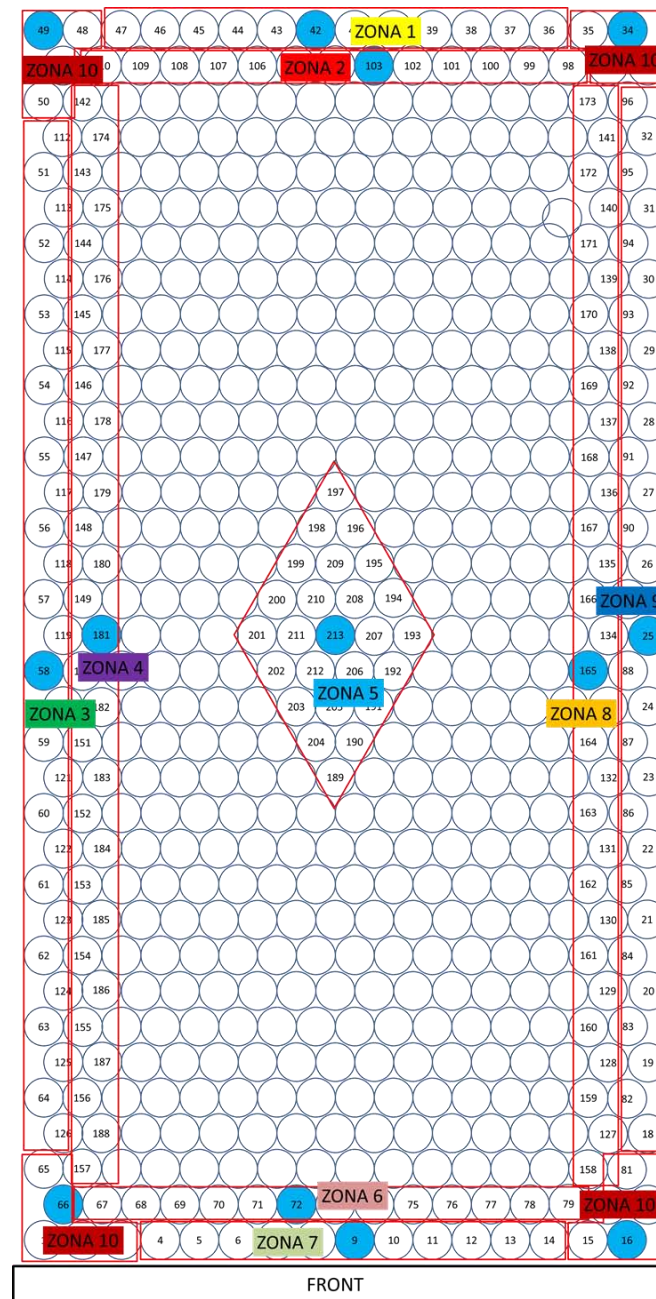


Figura 3.2 Disposizione dei flaconi a nido d'ape sopra il vassoio (vista dall'alto); si evidenzia la divisione in zone a differente contributo termico (riquadri rossi) e la posizione dei flaconi in cui viene posta la termocoppia (cerchi azzurri).

Il vassoio è stato circondato da una cornice metallica (*rail*). Per considerare il diverso comportamento termico dei flaconi all'interno della camera, l'area del vassoio è stata preliminarmente divisa in 10 zone differenti (vedi Figura 3.2), ciascuna delle quali contenente flaconi che si assume presentino identico comportamento termico. La fila frontale dei flaconi, direttamente esposta alla porta della camera del liofilizzatore, è rappresentata dalla zona 7, mentre i flaconi angolari sono associati alla zona 10. Le zone 3 e 9 rappresentano i flaconi laterali, le zone 2, 4, 6 e 8 comprendono i flaconi con comportamento intermedio, la zona centrale 5, meno esposta agli effetti termici delle pareti della camera, rappresenta i flaconi il cui prodotto sublima più lentamente. La bontà della divisione in zone è stata successivamente confermata tramite confronto sulle misure di coefficiente di trasferimento di calore (K_v) determinato gravimetricamente per le diverse zone (sezione 3.2.1.1). I valori delle variabili termodinamiche, geometriche e di processo utilizzate in tutti i modelli considerati sono riassunte in Tabella 3.1:

Tabella 3.1 Valore dei parametri termodinamici, geometrici e di processo.

Variabile	Valore	Unità di misura
λ_{frozen}	2.47	$W m^{-1} K^{-1}$
ρ_{frozen}	917	$kg m^{-3}$
ρ_{dried}	63	$kg m^{-3}$
ΔH_{sub}	2838.15e3	$J kg^{-1}$
σ_{sb}	5.67e-08	$W K^{-4} m^{-2}$
$c_{p,frozen}$	2108	$J kg^{-1} K^{-1}$
$d_{i,vial}$	0.01455	m
A_{vial}	1.662e-04	m^2
$L_{frozen,0}$	0.003609	m
T_w	250.15	K
T_r	250.15	K
V_c	0.316	m^3
R_g	8314.5	$J kmol^{-1} K^{-1}$
M_w	18.01	$kg kmol^{-1}$
N_{viats}	560	/
T_{cd}	193	K

Il valore di T_r è stato fissato da letteratura (Scutellà *et al.*, 2017a). Per T_{cd} e T_w si è osservato che i valori misurati durante il processo sono pressoché costanti, e quindi è stato fissato per T_{cd} un valore medio pari a $-80^\circ C$ mentre per T_w un valore medio pari a $-23^\circ C$.

3.2 Identificazione di modello: i tre approcci

L'attività di calibrazione (e validazione) di modello è stata implementata su Matlab® R2019a, 64 bit, ad eccezione del modello dinamico la cui calibrazione (e convalida) è stata implementata sul software gPROMS Model Builder v. 5.1.



Figura 3.3 Schematizzazione delle procedure di identificazione di modello implementate nel lavoro di Tesi.

Ciascuno dei tre approcci di acquisizione dati per calibrazione di modello presentati in questo lavoro di Tesi è associato a un diverso modello: il primo sfrutta il modello pseudo-stazionario presentato in §2.1 e necessita di 4 esperimenti (tre a differenti valori di pressione per la stima del parametro K_v e della sua dipendenza dalla pressione e uno per la stima del parametro R_p); il secondo sfrutta il modello implementato nel software associato al liofilizzatore Lyostar 3 (dotato di tecnologia SMART) e necessita di un unico esperimento di calibrazione eseguito in modo automatico; il terzo utilizza il modello dinamico descritto in §2.3 tramite il quale viene progettato, con tecniche convenzionali MBDoe (*model-based design of experiments*), un unico esperimento. Dopo aver ottenuto le stime parametriche per ciascun caso si procede alla fase di convalida tramite un nuovo esperimento condotto nelle condizioni seguenti:

- flaconi non siliconati da 3 mL infialati con 0.6 mL di soluzione di saccarosio al 5% w/w;
- pressione di camera costante pari a 50 mT;

- temperatura di fluido riscaldante nella fase di essicamento primario con rampa dalla temperatura di congelamento di -50°C a -32°C con una velocità di $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e successivamente temperature costante pari a -32°C ;
- sei termocoppie posizionate in punti strategici sulla piastra per l'individuazione del profilo di temperatura di fondo flacone della zona centrale (tre termocoppie utilizzate) e della zona esterna (tre termocoppie posizionate rispettivamente in posizione frontale, angolare e a fondo vassoio).

I dati sperimentali relativi all'esperimento di convalida sono riportati nella cartella "validation_experiment". In termini pratici, in fase di convalida si confrontano i dati sperimentali (in questo caso, la temperatura di fondo flacone e il tempo di fine sublimazione tramite valutazione dello spessore di strato ghiacciato) con i rispettivi profili predetti da ciascun modello. La schematizzazione del percorso logico proposto è rappresentata in Figura 3.3.

Nei paragrafi seguenti si presentano in dettaglio i risultati ottenuti applicando le tre metodologie sia in fase di calibrazione sia in fase di convalida.

3.2.1 Identificazione e convalida del modello pseudo-stazionario con metodo gravimetrico e stima da termocoppie

L'identificazione del modello pseudo-stazionario prevede l'utilizzo di 4 esperimenti: tre per la stima del parametro di trasferimento di calore e della sua dipendenza dalla pressione (Eq. 2.2) ed uno per la stima del parametro di trasferimento di massa. Una volta ottenuti i parametri, si procede alla fase di convalida, cioè i parametri stimati vengono utilizzati all'interno del modello per simulare alcune condizioni di processo testate poi sperimentalmente. Viene quindi valutata la capacità di predizione del modello di dal confronto tra le predizioni di temperatura del prodotto e tempo di fine sublimazione con i dati sperimentali.

La rappresentazione schematica dell'intera procedura di identificazione del modello pseudo-stazionario (calibrazione + convalida) con metodo gravimetrico è riportata di seguito:

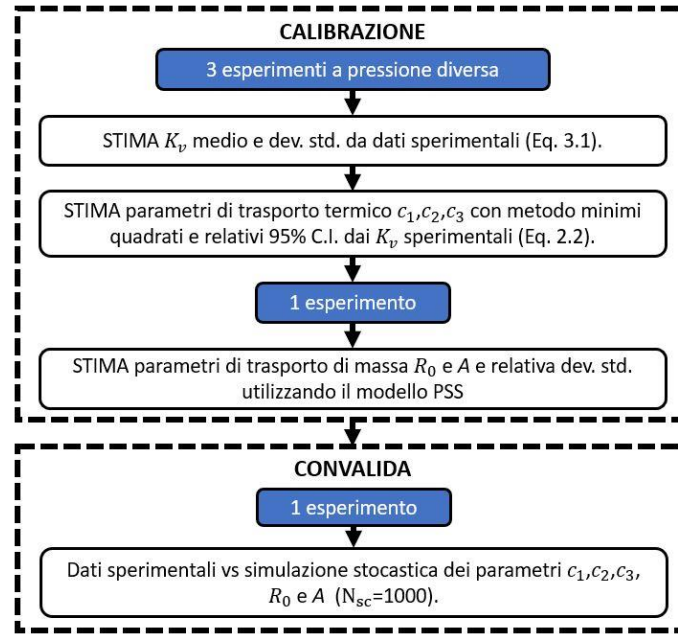


Figura 3.4 Schematizzazione della procedura di calibrazione e convalida del primo metodo.

3.2.1.1 Fase di calibrazione

Per la calibrazione del modello pseudo-stazionario è necessario stimare i coefficienti K_v e R_p (definiti nelle Eqs. 2.2 e 2.6) utilizzando dati sperimentali ottenuti conducendo più cicli di liofilizzazione.

Attraverso un semplice esperimento gravimetrico è stato possibile stimare K_v per i vari flaconi posti nel ripiano, infilandoli tutti i flaconi con acqua e misurando la perdita di peso Δm (kg) dovuta alla sublimazione del ghiaccio dopo un certo intervallo di tempo Δt (s) di essiccazione primario. L'equazione utilizzata è la seguente (Pikal *et al.* (1984)):

$$K_v = \frac{\Delta m \Delta H_s}{A_v \int_0^{\Delta t} (T_f - T_b) dt}, \quad (3.1)$$

dove A_v (m²) è l'area interna della sezione trasversale del flacone e ΔH_s (J kg⁻¹) è l'entalpia di sublimazione del ghiaccio. Misurando la perdita di peso dei flaconi numerati rappresentati in Figura 3.2, i cui dati sono riportati nella cartella 'deltam_calculations', è stato calcolato un K_v medio per ogni specifica zona. Data la dipendenza del parametro dalla pressione della camera, sono stati effettuati tre esperimenti a tre differenti valori di pressione, rispettivamente 30, 75 e 120 mT, impostando per tutti gli esperimenti la temperatura di fluido riscaldante costante a -28°C. La durata degli esperimenti non è stata impostata a priori, ma è stata variata

in base alla pressione della camera: maggiore è la pressione di camera, maggiore è la velocità di sublimazione e, quindi, minore la durata dell'esperimento.

Si ricorda, a titolo informativo, che in alternativa il coefficiente K_v può essere stimato con esperimenti *ad hoc* come il test ad aumento di pressione (*Pressure Rise Test, PRT*), proposto da Patel *et al.* 2010, e da Fissore *et al.* 2010, oppure utilizzando tecniche di spettroscopia ad assorbimento con laser al diodo (TDLAS, Kessler 2006, Kuu *et al.* 2009). Tali metodologie forniscono tuttavia una stima globale del coefficiente di scambio termico, non includendo di conseguenza informazioni sui singoli flaconi e sull'eterogeneità dello scambio termico, come avviene nel caso del metodo gravimetrico.

I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 3.2 e sono rappresentati in Figura 3.5. Come si può vedere in Tabella 3.2, maggiore è la pressione di camera e maggiore è il valore di K_v calcolato (questa dipendenza è evidenziata dall'Equazione 2.2) così come la variabilità interna delle zone laterali e angolari risulta maggiore di quella centrale. Inoltre, i flaconi presenti nelle zone angolari (zona 10) e laterali (zone 1,3,9,7) presentano un valore di K_v più elevato della zona centrale, dovuto all'effetto parete (approssimativamente maggiore del 43% a 30 mT e del 54% a 75 e 120 mT).

Tabella 3.2 Valori mediati e deviazioni standard di K_v a tre diversi valori della pressione di camera per ogni zona identificata del liofilizzatore rappresentata in Figura 3.2.

	$P_c = 30 \text{ mT}$		$P_c = 75 \text{ mT}$		$P_c = 120 \text{ mT}$	
	Valore [Wm ⁻² K ⁻¹]	Dev. Std	Valore [Wm ⁻² K ⁻¹]	Dev. Std	Valore [Wm ⁻² K ⁻¹]	Dev. Std
$K_{v,zona1}$	14.42	0.46	24.16	1.59	29.36	1.32
$K_{v,zona2}$	12.57	0.78	19.67	0.99	23.76	1.60
$K_{v,zona3}$	13.43	1.16	21.87	2.68	27.72	4.13
$K_{v,zona4}$	11.11	0.77	17.54	1.11	21.65	1.55
$K_{v,zona5}$	9.73	0.27	15.98	0.67	19.90	0.84
$K_{v,zona6}$	13.45	0.62	21.12	0.76	26.85	1.86
$K_{v,zona7}$	14.56	0.49	26.34	1.00	34.10	1.15
$K_{v,zona8}$	11.46	1.00	18.35	1.50	22.83	2.03
$K_{v,zona9}$	12.81	1.26	23.11	2.96	27.78	3.50
$K_{v,zona10}$	14.52	0.52	27.51	3.95	33.79	4.74

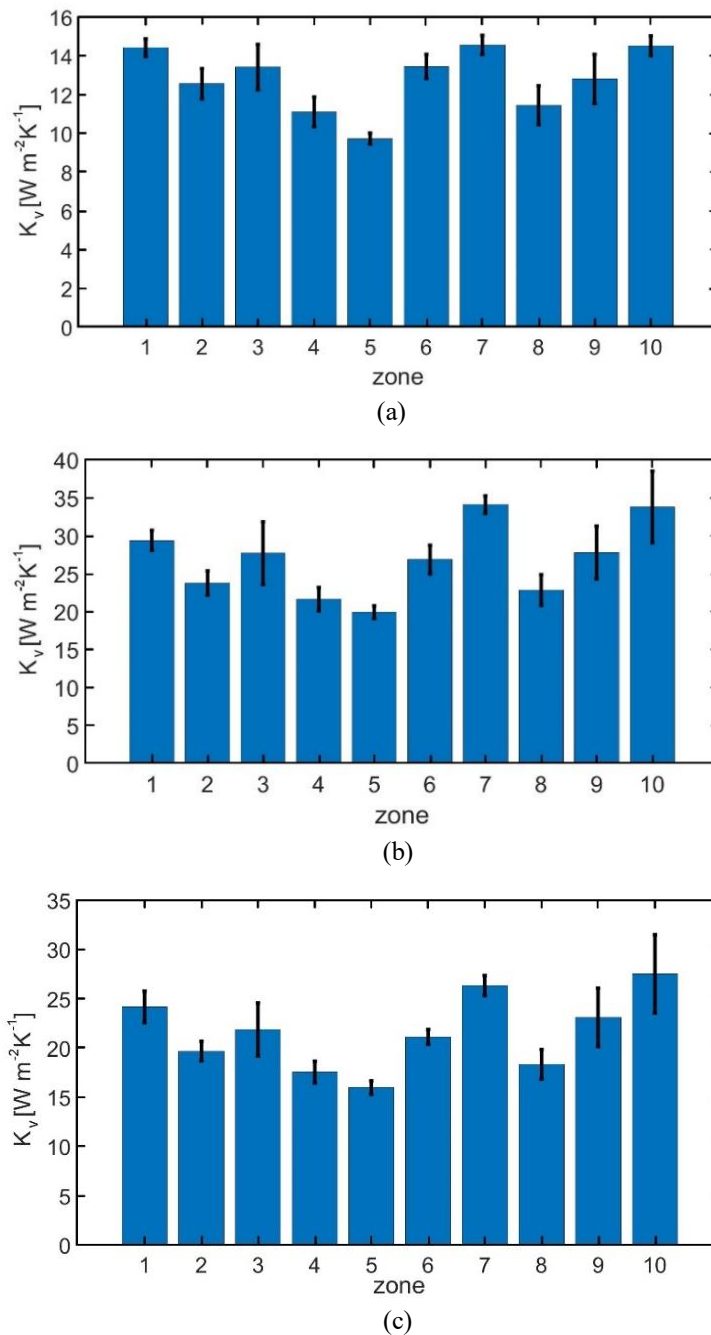


Figura 3.5 Istogramma dei valori mediati di K_v ottenuti per le varie zone a tre diversi valori di pressione, a) 30 mT, b) 75 mT, c) 120 mT.

Dai valori di K_v così ottenuti è quindi possibile calcolare i coefficienti c_1 , c_2 e c_3 (vedi Eq 2.2), eseguendo una regressione ai minimi quadrati non lineari dei valori di K_v sperimentali alle diverse pressioni.

In Tabella 3.3 vengono rappresentate le stime di c_1 , c_2 e c_3 , mentre in Figura 3.6 è rappresentata, a titolo di esempio, la curva di regressione di K_v ottenuta dai dati sperimentali per la zona centrale (zona 5) utilizzando il codice presente nella cartella 'kv_estimation'. La scelta di

focalizzarsi unicamente sulla zona centrale nasce dal fatto che essa contiene il maggior numero di flaconi ed è pertanto rappresentativa del comportamento della maggior parte dei flaconi caricati. Si precisa che il valore di K_v che si ottiene per questo modello è una somma del: (i) contributo di conduzione attraverso il vetro del flacone e lo strato gassoso che si forma nell'intercapedine tra flacone e vassoio; (ii) contributo di irraggiamento dovuto alla temperatura della parete (il valore di c_1 infatti varia da zona a zona includendo fenomeni di irraggiamento dipendenti dalla posizione del flacone sul vassoio). Il valore di K_v ottenuto per questo modello non è pertanto confrontabile con quello che si otterrà calibrando il modello dinamico, in cui il fenomeno di irraggiamento non è incluso nel suddetto parametro.

Tabella 3.3 Valori di c_1 , c_2 e c_3 e deviazioni standard per i flaconi nella zona centrale.

	Valore	Dev. Std.
c_1 [$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$]	2.98	0.81
c_2 [$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1} \text{Pa}^{-1}$]	2.11	0.33
c_3 [Pa^{-1}]	0.06	0.015

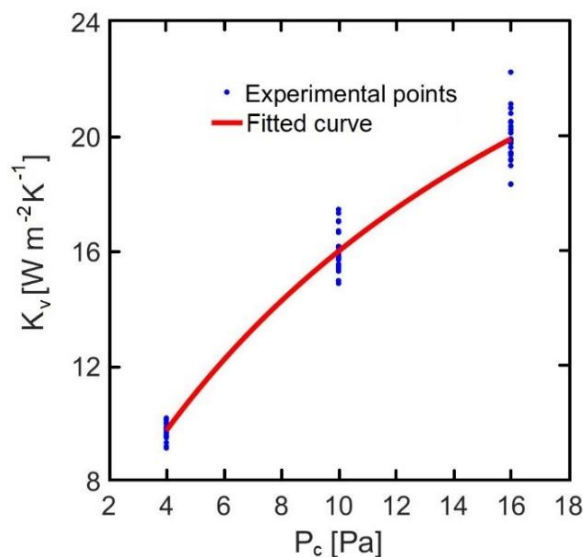


Figura 3.6 K_v vs P_c per ottenere i parametri c_1 , c_2 e c_3 utilizzando i dati sperimentali della zona centrale.

Dopo aver stimato il coefficiente di trasporto termico, si procede con la stima del coefficiente R_p , parametro che rappresenta la resistenza che lo strato secco oppone al flusso di sublimazione del vapore durante il processo. Esso può essere stimato in diversi modi:

- a partire dai dati di K_v ottenuti precedentemente e implementando, come metodo di stima, una regressione non lineare con minimizzazione della funzione di massima verosimiglianza dei dati di temperatura sperimentali ottenuti tramite uno o più cicli di liofilizzazione (Fissore *et al.*, 2015).

- tramite test ad aumento di pressione (PRT);
- tramite tecniche di spettroscopia ad assorbimento con laser al diodo (TDLAS).

In questo lavoro di Tesi, il coefficiente R_p (più precisamente i coefficienti che lo compongono: R_0 e A, B di Eq. 2.6), è stimato seguendo il primo metodo dell'elenco precedente, fissando K_v al valore medio ottenuto per la zona interna a 75 mT (pari a $15.98 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ (vedi Tabella 3.2)) e implementando la regressione con minimizzazione della funzione di massima verosimiglianza sulla temperatura misurata per la zona centrale. Come menzionato in §1.3.1, si deve tenere presente che le termocoppie possono agire da sito di nucleazione ed aumentare la velocità di sublimazione; pertanto, le misure di temperatura ottenute in flaconi in cui è inserita la termocoppia non descrivono esattamente il comportamento dei flaconi non monitorati appartenenti alla stessa zona (presenti in numero molto maggiore); questo comporta di conseguenza una leggera sottostima dei parametri di trasferimento di massa.

L'esperimento di calibrazione è stato condotto a una pressione di camera di 75 mT, caricando un vassoio completo di flaconi infialati con 0.6 mL di soluzione di saccarosio al 5% w/w; la temperatura dell'olio siliconico è stata mantenuta a -28°C fino a completamento della fase di essiccamento primario, implementando una rampa di $1^\circ\text{C}/\text{min}$ da -50 a -28°C . I profili delle variabili manipolabili sono rappresentati in Figura 3.7, mentre in Figura 3.8 è riportato il profilo sperimentale di T_b ed il profilo fittato ottenuto dalla calibrazione dei parametri R_0 e A .

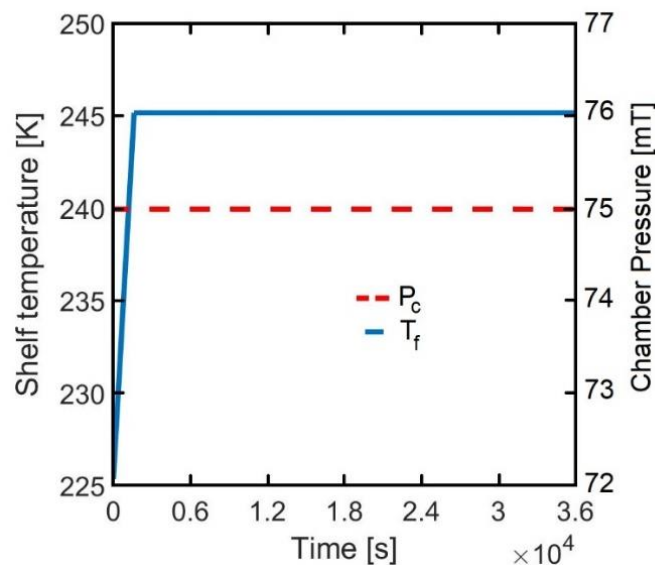


Figura 3.7 Profili delle variabili manipolabili dell'esperimento di calibrazione del parametro di trasferimento di massa (profili blu: T_f ; profilo rosso P_c).

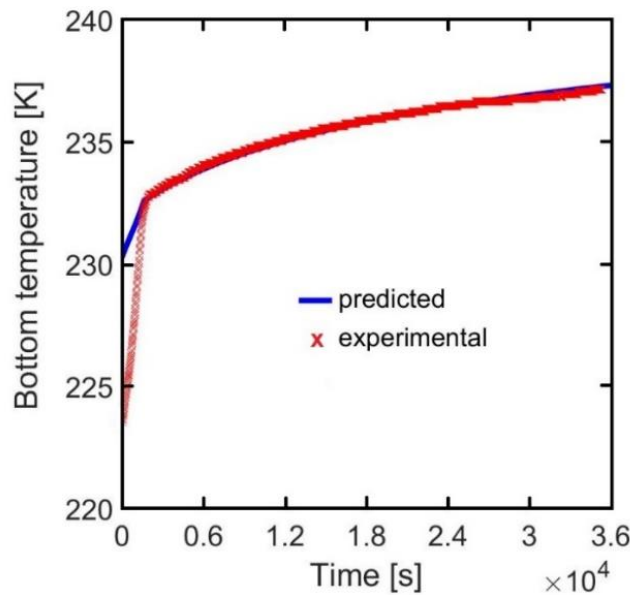


Figura 3.8 Valori sperimentali vs profili fittati in seguito alla calibrazione del parametro di trasferimento di massa (rosso: punti sperimentali, blu: profilo predetto).

Dato che il parametro R_p è considerato costante al variare della pressione si è ritenuto non necessario condurre ulteriori esperimenti a differenti condizioni di pressione. Si precisa che per la stima di R_p sono stati considerati solo i parametri R_0 e A ; Il parametro B (Eq. 2.6) non è incluso nel *set* di calibrazione data la bassa sensitività locale sulla temperatura del prodotto ed è fissato al valore di 20.69 m^{-1} , ottenute da stime precedenti sulla base di dati storici. La stima è stata eseguita considerando i dati di temperatura che precedono il flesso relativi alla termocoppia posizionata nella zona centrale ed implementando come funzione obiettivo da minimizzare la funzione di massima verosimiglianza, descritta come segue:

$$obj = \sum_{i=1}^{N_{meas}} \left(\frac{(T_{b,i,exp} - T_{b,i,calc})^2}{2\sigma_{i,exp}^2} + \ln \sqrt{2\pi\sigma_{i,exp}^2} \right). \quad (3.2)$$

dove obj è il valore che assume la funzione obiettivo, $T_{b,i,exp}$ (K) è il valore di temperatura sperimentale di fondo flacone misurata dalla termocoppia al tempo i -esimo, $T_{b,i,calc}$ (K) è il valore di temperatura di fondo flacone calcolata dal modello pseudo-stazionario al tempo i -esimo, $\sigma_{i,exp}$ è l'errore sulla misura (assunta pari a 0.1 K) e N_{meas} corrisponde al numero di misurazioni.

Tuttavia, per tenere implicitamente in considerazione anche il contributo di pressione nella stima, la funzione obiettivo da minimizzare è stata modificata come segue:

$$obj_{fin} = \sum_{i=1}^{N_{meas}} \left(\frac{(T_{b,i,exp} - T_{b,i,calc})^2}{2\sigma_{i,exp}^2} + \ln \sqrt{2\pi\sigma_{i,exp}^2} \right) + \frac{(L_{f,offset,exp} - L_{f,offset,calc})^2}{2\sigma_{L_f}^2} + \ln \sqrt{2\pi\sigma_{L_f}^2}. \quad (3.3)$$

dove σ_{L_f} è l'errore di misura dello spessore di strato ghiacciato assunto pari a $1e-5$ m, $L_{f,offset,calc}$ è il valore dello spessore dello strato ghiacciato calcolato al tempo di *offset* (90880 s circa) e $L_{f,offset,exp}$ è il valore dello spessore di strato ghiacciato "sperimentale", assunto pari a $1e-6$ m, al tempo di *offset* dell'esperimento (profilo Pirani parallelo al profilo capacitivo, vedi §1.3.2).

In pratica, il passaggio da Eq 3.2 a Eq. 3.3 aggiunge l'implementazione della condizione di coincidenza a fine essiccamento primario tra la totale rimozione dello strato di ghiaccio dal flacone più lento (fine fase essiccamento primario) e il tempo la condizione in cui il profilo Pirani diventa parallelo al profilo capacitivo (*offset*, corrispondente a circa 90880 s per l'esperimento considerato).

I dati sperimentali ed il codice di calcolo Matlab utilizzati per la stima sono reperibili nella cartella 'Rp_estimation', mentre in Tabella 3.4 sono riportati i valori stimati di R_0 e A , con relativa deviazione standard.

Tabella 3.4 Valore dei parametri di trasferimento di massa e relativa variazione standard, stimati attraverso il modello pseudo-stazionario.

	Valore	Dev. Std
R_0 [m s ⁻¹]	2.28e4	2.02
A [s ⁻¹]	1.08e8	139

Come precisato precedentemente, per stimare R_0 e A il parametro K_v è stato impostato pari al valore medio ottenuto per la zona centrale dai dati sperimentali a 75 mT ($15.98 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$), senza considerare l'incertezza sperimentale ($0.67 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$). Questa decisione è supportata dall'analisi della matrice di correlazione tra i parametri R_0 , A e K_v in Tabella 3.5; per dettagli in merito al calcolo di tale matrice si rimanda al codice di calcolo riportato nella cartella 'parameter_correlation'.

Tabella 3.5 Matrice di correlazione dei parametri R_0 , A e K_v .

	R_0	A	K_v
R_0	1.00	0.69	-0.77
A	0.69	1.00	-0.96
K_v	-0.77	-0.96	1.00

I dati riportati in Tabella 3.5 evidenziano un'alta correlazione tra i parametri K_v e A ; coefficienti di correlazione vicini a ± 1 sono indice di forte correlazione (o anti-correlazione) parametrica. Ciò può portare ad un'amplificazione dell'errore sulle stime di R_0 e A dovuta alla propagazione dell'errore di stima di K_v . Per questo motivo, è stato deciso di non propagare l'incertezza del parametro K_v nella stima dei parametri R_0 e A , mantenendo i valori delle rispettive deviazioni standard a quelli riportati in Tabella 3.4. In definitiva, i parametri stimati in questo caso studio che sfrutta il modello pseudo-stazionario, sono cinque: due parametri di trasferimento di massa R_0 e A (B fissato) riportati in Tabella 3.4, e tre parametri di trasferimento di calore c_1 , c_2 e c_3 riportati in Tabella 3.3. Per la stima dei parametri sono stati necessari in tutto 4 esperimenti.

3.2.1.2 Fase di convalida

La fase di convalida consiste nel confronto tra i dati sperimentali ottenuti con un nuovo esperimento condotto seguendo le condizioni operative descritte in §3.2 e i valori simulati ottenuti utilizzando nel modello pseudo-stazionario i valori parametrici ottenuti in fase di calibrazione (vedi Tabella 3.3 e 3.4). Si precisa che, al fine di considerare l'impatto dovuto all'incertezza delle stime parametriche, è stata implementata una simulazione stocastica, con 1000 scenari; ciascun scenario rappresenta la risposta del modello a valori differenti dei parametri c_1 , c_2 , c_3 , R_0 e A , campionati in maniera casuale assumendo che ciascuno segua una distribuzione di tipo normale, con valor medio e deviazione standard riportate in Tabella 3.3 e 3.4.

Il codice di calcolo utilizzato per la fase di convalida per questo caso studio è riportato nella cartella "first_method_validation". Il confronto tra i profili di temperatura di fondo flacone relativi alla zona centrale simulati dal modello e i dati sperimentali (sino al raggiungimento del punto di flesso) ottenuti per la zona centrale (dati da 3 termocoppie) sono rappresentati in Figura 3.9. Inoltre, si riportano in Figura 3.10 i profili simulati dello spessore dello strato ghiacciato per la zona centrale, confrontato con i valori sperimentali di *onset*, *midset* (cambio concavità del profilo del sensore Pirani) e *offset* derivati dal confronto tra le misure del manometro capacitivo e del manometro Pirani.

Il calcolo del tempo di *onset*, *offset* e cambio concavità, rappresentati in Figura 3.10 è infatti basato sul confronto tra i valori di pressione registrati dal manometro Pirani e dal manometro capacitivo. Il tempo di *onset* è l'istante a cui la lettura di pressione data dal Pirani inizia a diminuire in concomitanza della fine della fase di essiccamento primario, il tempo di *offset* è il tempo in cui i due profili diventano paralleli in concomitanza della rimozione dell'acqua dalla

camera a fine sublimazione, mentre l'istante a cui avviene il cambio di concavità del profilo del Pirani è collocato all'interno dell'intervallo di tempo compreso tra *onset* ed *offset* (vedi §1.3.2).

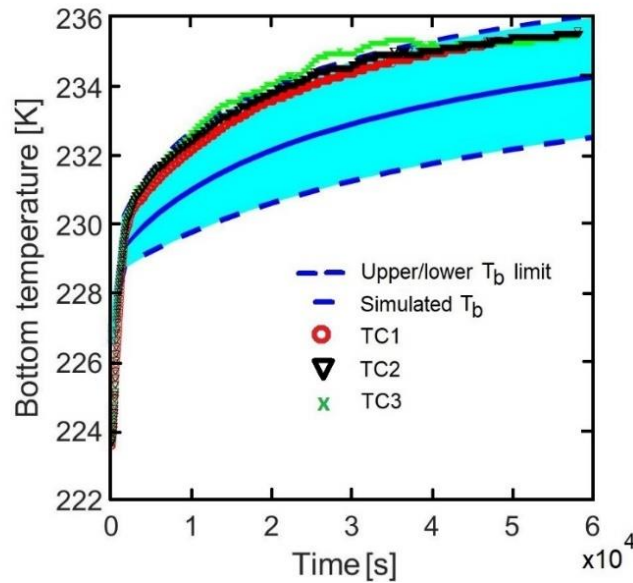


Figura 3.9 Esperimento di convalida: profili di temperatura di fondo flacone ottenuti con simulazione stocastica per il modello pseudo-stazionario (regione azzurra), dati sperimentali ottenuti dall'esperimento di convalida TC1 TC2 e TC3 (termocoppie della zona centrale rappresentate dalle linee spesse rossa, verde e nera), intervalli di predizione al 95% (linee tratteggiate).

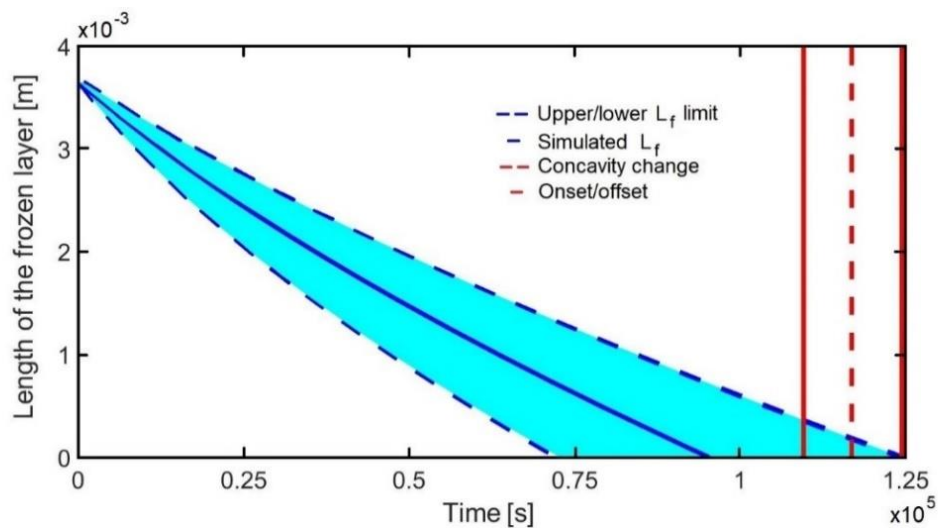


Figura 3.10 Esperimento di convalida: profili di L_{frozen} ottenuti con simulazione stocastica per il modello pseudo-stazionario (regione azzurra). Le linee tratteggiate blu rappresentano gli intervalli di predizione al 95%. Le tre linee rosse rappresentano rispettivamente il tempo di: (i) onset ($t=109580$ s), (ii) midset ($t=116840$ s) e offset ($t=124420$ s) basati sui profili di pressione sperimentali manometro Pirani-manometro capacitivo dell'esperimento di convalida.

Dall'analisi di Figura 3.10 si può notare che il tempo di *onset* è pari a circa 30.4 ore, mentre il tempo di *offset* è pari a 34.5 ore. Si ricorda che questo istante corrisponde al momento in cui la

fase di essiccamento primario ha termine in quanto la pressione di vapore d'acqua in camera, sostenuta dalla sublimazione dei flaconi, diventa pari alla pressione di camera (tutti i flaconi hanno terminato la sublimazione in particolare i flaconi centrali che sono meno soggetti al contributo di irraggiamento delle pareti). Di conseguenza, il momento in cui lo spessore dello strato ghiacciato diventa pari a zero dovrebbe corrispondere al tempo di *offset* ed i vari scenari simulati dovrebbero ricadere internamente alla regione compresa tra tempo di *onset* ed *offset*. Da questa considerazione si può affermare che la calibrazione del modello pseudo-stazionario ottenuta con metodo gravimetrico e stima da termocoppie è in grado di fornire una descrizione ragionevole del comportamento dei flaconi centrali, in quanto: (i) considerando i vari scenari di L_{frozen} , il profilo medio risulta sottostimato; tuttavia, parte degli scenari simulati ricade internamente all'intervallo *onset-offset* sperimentale; (ii) i profili della temperatura di fondo flacone simulati rispecchiano i profili sperimentali, nonostante il profilo medio sia sottostimato rispetto ai profili sperimentali.

Da sottolineare che, la dispersione dei profili ottenuti in fase di simulazione stocastica risulta molto ampia, limitando la precisione in fase di predizione. Questo è dovuto all'elevato valore di deviazione standard ottenuto per il parametro K_v in fase di calibrazione, data dal basso numero di esperimenti eseguiti. L'approccio di calibrazione utilizzato, per quanto concerne la struttura del modello, rischia di propagare l'incertezza di tutti i parametri e di ottenere stime statisticamente irrilevanti.

3.2.2 Identificazione di modello con tecnologia SMART

Il secondo metodo proposto sfrutta la tecnologia SMART associata al liofilizzatore Lyostar 3. La fase di calibrazione richiede un unico esperimento eseguito in maniera automatica dal liofilizzatore stesso. Dai parametri ottenuti si procede poi alla fase di convalida con l'esperimento scelto e all'analisi dei risultati ottenuti. Nei paragrafi successivi verrà descritta in dettaglio la procedura di calibrazione e la fase di convalida.

Si riporta in Figura 3.11 la rappresentazione schematica dell'intera procedura di identificazione del modello pseudo-stazionario (calibrazione + convalida) tecnologia SMART.

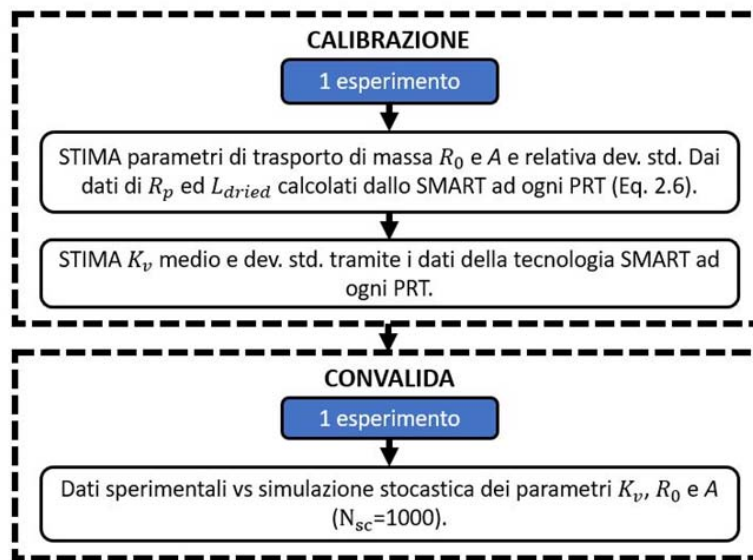


Figura 3.11 Schematizzazione della procedura di calibrazione e convalida del secondo metodo.

3.2.2.1 Fase di calibrazione

L'esperimento di calibrazione consiste nel caricare un vassoio di flaconi infialati con la soluzione scelta (saccarosio 5% w/w), lasciando vuote le due file esterne, per un totale di 403 flaconi. Questa procedura è richiesta dal manuale per ottenere una calibrazione ottimale del modello implementato nel software. Le variabili in ingresso da inserire nell'interfaccia software sono:

- tipo di contenitore utilizzato per liofilizzare il prodotto: flaconi nel nostro caso;
- stato del formulato (amorfo o cristallino): la soluzione processata in questo lavoro di Tesi è di natura amorfa;
- densità del soluto: nel caso del saccarosio la densità è pari a 1.5 g cm^{-3} ;
- numero di flaconi infialati presenti nella camera del liofilizzatore: pari a 403 (72% del totale);
- area interna del flacone: $1.62 \times 10^{-4} \text{ m}^2$;
- volume di riempimento del flacone: 0.6 mL;
- concentrazione della soluzione: 5% w/w;
- temperatura di collasso del prodotto: -34°C per il saccarosio;
- intervallo di tempo tra due PRT: 60 min.

Il liofilizzatore, come descritto nel Capitolo 2, utilizza un meccanismo di controllo automatico in linea per impostare le tempistiche di esecuzione dei diversi PRT eseguiti nel corso dell'esperimento e aggiornare, di conseguenza, la ricetta dopo ogni PRT (i.e. il profilo

temporale delle variabili manipolabili) per la fase di essiccamento primario. Ad ogni PRT, utilizzando le equazioni enunciate nel Capitolo 2 (§2.2), il software stima i valori di grandezze del processo, quali, P_{ice} , X , R_p , L_{dried} , L_{frozen} , K_v , i cui dati sono riportati nel file Excel ‘SMART_results.xlsx’. Dai valori di R_p ed L_{dried} così ottenuti, riportati in Tabella 3.6, è stato possibile ottenere, attraverso una procedura di regressione non lineare, il valore dei parametri R_0 e A in Eq. 2.6; B è fissato pari a 20.69 m^{-1} . Il codice utilizzato è salvato nella cartella ‘massparameters_estimation_SMART’ ed i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.7. La media e la deviazione standard del parametro K_v invece, sono state calcolate considerando i valori forniti dal software al termine di ogni PRT (vedi i sei dati sperimentali riportati in Tabella 3.6; i valori finali ottenuti sono riportati in Tabella 3.7):

Tabella 3.6 Valori di R_p , L_{dried} , K_v e L_{frozen} forniti dalla tecnologia SMART, per ogni Pressure Rise Test.

	PRT_1	PRT_2	PRT_3	PRT_4	PRT_5	PRT_6
R_p [m s ⁻¹]	9.16e4	1.27e5	1.27e5	1.30e5	1.47e5	1.64e5
L_{dried} [m]	3.18e-4	8.62e-4	1.25e-3	1.62e-3	2.16e-3	2.48e-3
K_v [W m ⁻² K ⁻¹]	16.19	16.32	16.02	15.44	13.22	11.67
L_{frozen} [m]	3.62e-3	3.07e-3	2.69e-3	2.32e-3	1.78e-3	1.46e-3

Tabella 3.7 Valori di R_0 e A ottenuti dalla stima ai minimi quadrati non lineari dell’equazione (2.6) e valore medio e deviazione standard del parametro K_v , manometro capacitivo dell’esperimento di convalida.

	Valore	Dev. Std.
R_0 [m s ⁻¹]	8.90e4	1.04e4
A [s ⁻¹]	3.01e7	6.68e6
K_v [W m ⁻² K ⁻¹]	14.81	1.92

In sintesi, nel modello utilizzato applicando la tecnologia SMART i parametri stimati sono tre: due parametri di trasferimento di massa R_0 e A , ed un parametro globale di trasferimento di calore K_v .

3.2.2.2 Fase di convalida

La fase di convalida consiste nel confronto tra i dati sperimentali ottenuti con un nuovo esperimento condotto seguendo le condizioni operative descritte in §3.2 e i valori simulati ottenuti aggiornando i parametri del modello pseudo-stazionario ai valori ottenuti in fase di calibrazione utilizzando la tecnologia SMART (vedi Tabella 3.7). Dal momento che il modello implementato dalla tecnologia SMART non è fornito, si è deciso di utilizzare il modello pseudo-stazionario in quanto coinvolge i medesimi parametri di trasferimento di massa e di calore. Il codice di calcolo è riportato nella cartella “second_method_validation”.

Anche in questo caso sono stati simulati 1000 scenari; ognuno rappresenta la risposta del modello a valori differenti dei parametri K_v , R_o e A campionati in maniera casuale assumendo che ciascuno segua una distribuzione di tipo normale, con valor medio e deviazione standard riportate in Tabella 3.7. I profili ottenuti della temperatura di fondo flacone per la zona centrale, comparato con i dati sperimentali, sono riportati in Figura 3.12, mentre in Figura 3.13 è riportato il confronto tra il profilo dello strato ghiacciato e i valori di *onset/offset/cambio concavità* sperimentali.

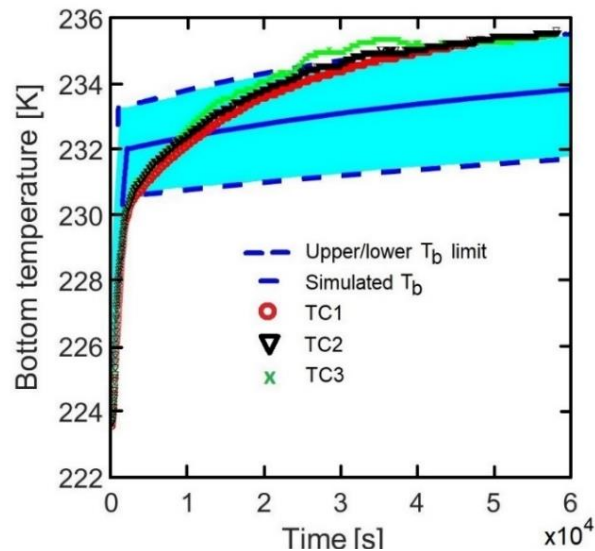


Figura 3.12 Esperimento di convalida: profili di temperatura di fondo flacone ottenuti con simulazione stocastica per il modello pseudo-stazionario attraverso la calibrazione con tecnologia SMART (regione azzurra) e dati sperimentali ottenuti dall'esperimento di convalida (linee spesse: rossa, verde e nera).

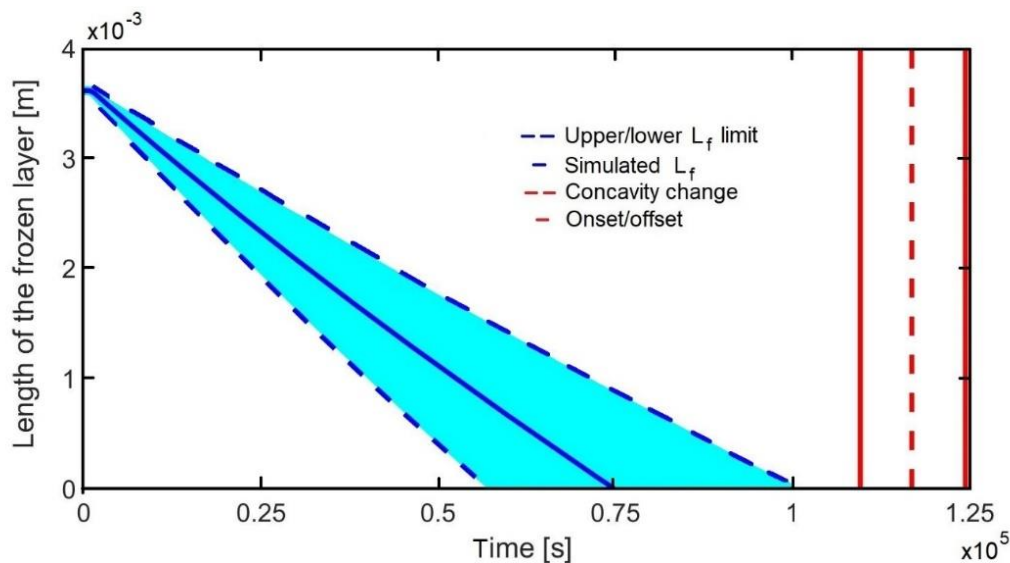


Figura 3.13 Esperimento di convalida: profili temporali di L_{frozen} ottenuti con simulazione stocastica per il modello pseudo-stazionario attraverso la calibrazione con tecnologia SMART (regione azzurra). Le tre linee rosse rappresentano rispettivamente il tempo di: (i) onset ($t=109580$ s), (ii) cambio concavità ($t=116840$ s) e offset ($t=124420$ s) basati sui profili di pressione sperimentali manometro Pirani-manometro capacitivo.

Dalla Figura 3.12 e 3.13 si nota che la predizione del modello con questo secondo metodo non è ottimale in quanto, nonostante il *range* dei profili di temperatura calcolati includa i valori sperimentali, l'andamento è totalmente differente. Il tempo stimato di fine fase primaria è molto inferiore a quello reale, mediamente anticipato di circa 8 ore, il che porta ad affermare che la calibrazione ottenuta con il secondo metodo non garantisce buone prestazioni in fase di convalida. Da sottolineare che è stato assunto il modello pseudo-stazionario per la fase di predizione, pur non essendo assicurata la coincidenza con il modello utilizzato dalla tecnologia SMART per la successiva ottimizzazione della ricetta.

3.2.3 Identificazione e convalida del modello dinamico tramite esperimento progettato con MBDoE

L'identificazione del modello dinamico prevede un unico esperimento, progettato tramite MBDoE, utilizzando le equazioni descritte al paragrafo §2.3. La differenza principale rispetto agli altri due metodi è la distinzione tra due zone del liofilizzatore, centrale ed esterna. Ciò consente di descrivere con maggior precisione l'eterogeneità dell'entità dei meccanismi di trasferimento di massa e di calore durante la fase di essiccamento primario del processo di liofilizzazione all'interno della camera. Nei paragrafi seguenti verrà descritta la fase di calibrazione e la successiva convalida del modello, con riferimento alla capacità dello stesso di riprodurre i dati sperimentali.

La rappresentazione schematica dell'intera procedura di identificazione del modello dinamico (calibrazione + convalida) tramite MBDoE è riportata di seguito:

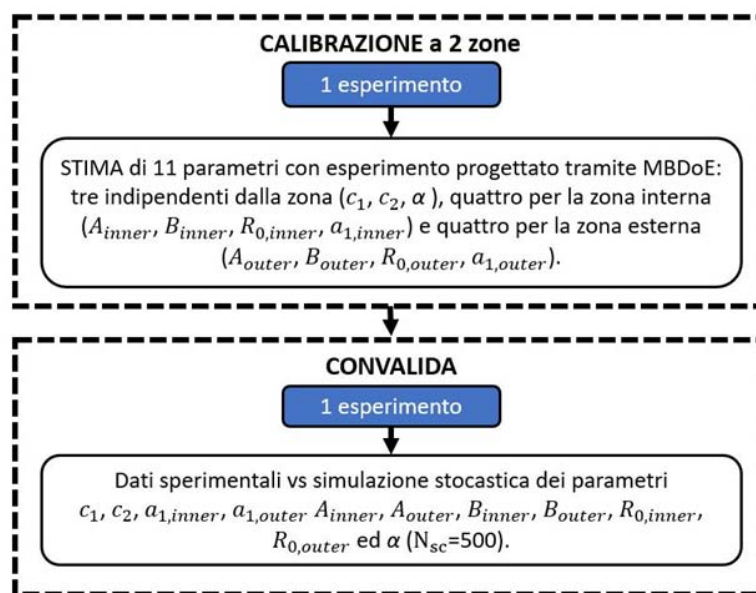


Figura 3.14 Schematizzazione della procedura di calibrazione e convalida del terzo metodo.

3.2.3.1 Fase di calibrazione

La calibrazione del modello dinamico è stata effettuata con il software gPROMS utilizzando un esperimento progettato tramite MBDoe (*Model Based Design of Experiments*, Franceschini e Macchietto (2007)) a partire da stime parametriche preliminari ottenute per un diverso liofilizzatore (Virtis Genesis 25EL (SP Scientific)) e impostando come metodologia di progettazione il criterio *D-optimal*, selezionabile nell'entità *Design of Experiments* del software. La ricetta ottimale risultante, implementata nell'esperimento di calibrazione, consiste nella manipolazione delle variabili manipolabili P_c e T_f , come rappresentato in Figura 3.15 è riportato in Tabella 3.8. L'esperimento è stato progettato per una durata di 10h, tuttavia l'esperimento è stato condotto fino al termine della fase primaria e la stima parametrica è stata effettuata sull'intero profilo di temperatura disponibile (precedente il punto di flesso).

I dati sperimentali dell'esperimento di calibrazione progettato sono riportati nella cartella "gPROMS_parameters_estimation". Si ricorda che in questo caso il modello da calibrare non è a singola zona, ma a due zone (centrale e laterale). La percentuale di flaconi considerati appartenenti alla zona centrale è pari al 72% (ossia 403 flaconi su 560), mentre la zona laterale include il restante 28% dei flaconi totali.

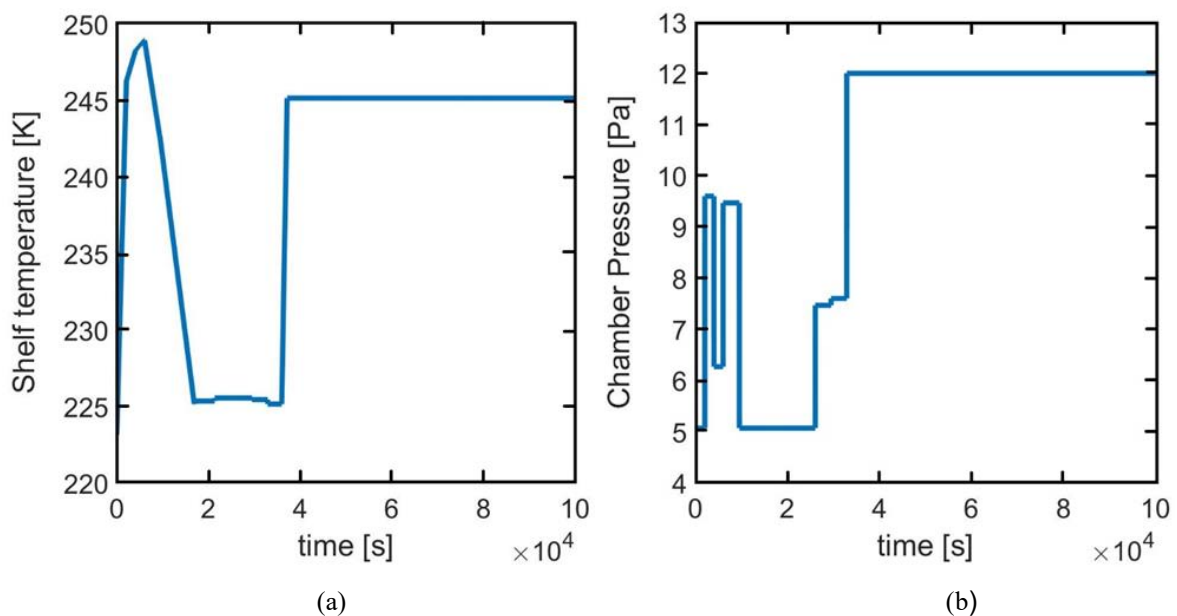


Figura 3.15 Profili delle variabili manipolabili implementati per la calibrazione dei parametri del modello dinamico: a) T_f , b) P_c .

Tabella 3.8 Valori assunti dalle variabili manipolabili per ogni intervallo di tempo. La temperatura di fluido varia linearmente nel tempo da $T_{f,initial}$ a $T_{f,final}$ mentre la pressione rimane costante per ogni l'intervallo.

Intervallo temporale [s]	Variabili manipolabili		
	P_c [Pa]	$T_{f,initial}$ [K]	$T_{f,final}$ [°C]
0-2130	5.06	223.15	246.25
2130-4080	9.60	246.25	248.25
4080-6060	6.27	248.25	248.95
6060-9600	9.47	248.95	242.25
9600-16920	5.07	242.25	225.15
16920-21360	5.03	225.15	225.00
21360-26100	5.07	225.00	224.80
26100-29526	7.47	224.80	224.80
29526-32940	7.60	224.80	224.90
32940-36000	12.00	224.90	225.00
36000-37120	12.00	225.00	245.15
>37120	12.00	245.15	245.15

Il numero di parametri da stimare per il modello dinamico è 19, cioè i 9 parametri di trasporto di massa/energia per ciascuna zona ed il parametro α associato alla portata di vapore inviata al condensatore (§2.3). Dei 19 parametri totali da stimare: (i) tre sono stati assunti pari a $1e-6$ e fissati ad un valore unico uguale per entrambe le zone, in quanto disponibili da esperimenti precedenti, cioè a_3 [-], c_3 [Pa^{-1}] e a_2 [m^2]; (ii) tre sono identici per entrambe le zone: c_1 e c_2 , in quanto dipendono dalle caratteristiche tecniche del flacone e dalla pressione in camera; α che è relativo al condensatore; (iii) quattro differiscono da zona a zona: A , B , R_0 e a_1 (che diventeranno, rispettivamente: A_{inner} , B_{inner} , $R_{0,inner}$, $a_{1,inner}$ per la zona interna e A_{outer} , B_{outer} , $R_{0,outer}$, $a_{1,outer}$ per quella esterna). Si precisa che il set parametrico sopra descritto include anche parametri non considerati in fase di progettazione dell'esperimento; in fase di progetto, infatti, B ed R_0 sono stati considerati come parametri fissati e indipendenti dalla zona di riferimento, data la bassa sensitività locale di B rispetto alla variabile temperatura e l'assunzione che la resistenza iniziale al trasporto termico R_0 fosse esclusivamente dipendente dal formulato e non dalla posizione del flacone. Tuttavia, si è ritenuto opportuno differenziare e stimare per ogni zona i rispettivi parametri R_0 e B per includere l'effetto dovuto a differenti velocità di congelamento per zone diverse, da cui conseguono differenti condizioni iniziali di sublimazione. In Tabella 3.9 sono riportate le stime parametriche ottenute dalla calibrazione in gPROMS del modello dinamico.

Tabella 3.9 Valori dei parametri ottenuti dalla calibrazione in gPROMS del modello dinamico, le relative deviazioni standard ed i *t*-value. Le voci 'inner' ed 'outer' sono riferite rispettivamente alla zona centrale e laterale del vassoio caricato nel liofilizzatore.

Parametro	Valore	Dev. Std.	<i>t</i> -value al 95%
c_1 [W m ⁻² K ⁻¹]	5.17	0.055	88.25
c_2 [W m ⁻² K ⁻¹ Pa ⁻¹]	0.26	0.003	49.89
α [Pa s kg ⁻¹ K ⁻¹]	1189.30	3.30	56.04
A_{inner} [s ⁻¹]	5.1e8	5.82e6	106.9
A_{outer} [s ⁻¹]	4.14e8	2.75e6	81.63
$\alpha_{1,inner}$ [m ²]	5.764e-5	1.05e-7	380.5
$\alpha_{1,outer}$ [m ²]	2.493e-4	7.69e-7	323.1
B_{inner} [m ⁻¹]	794.40	42.43	63.22
B_{outer} [m ⁻¹]	234.30	9.54	24.46
$R_{0,inner}$ [m s ⁻¹]	1.05e5	1.93e3	56.94
$R_{0,outer}$ [m s ⁻¹]	5.73e4	503.77	64.85
<i>t</i>-value di riferimento			1.645

La calibrazione del modello è stata eseguita: (i) minimizzando la funzione obiettivo rappresentata in Eq. 3.3, utilizzando i dati sperimentali di temperatura registrati dalla termocoppia posta nel flacone in posizione frontale che presenta i valori di temperatura più alti, per quanto riguarda la zona esterna e dalla termocoppia posta nel flacone centrale che presenta i valori di temperature più bassi, per quanto concerne la zona interna; (ii) considerando l'*end point* determinato dai sensori di pressione nella funzione obbiettivo (Eq. 3.3) per ottenere in maniera implicita un'indicazione relativa alla fine della fase di essiccamento primario, al fine di ottenere una maggior precisione in fase di stima. A livello pratico, è stata implementata come vincolo per la calibrazione la coincidenza tra la totale rimozione dello strato di ghiaccio per i flaconi presenti nella zona interna (fine fase essiccamento primario) e la condizione in cui il profilo Pirani diventa parallelo al profilo capacitivo (*offset*, corrispondente a circa 109000 s per l'esperimento considerato). I profili di temperatura di fondo flacone relativi alla zona centrale e laterale, ottenuti tramite la calibrazione del modello, sono rappresentati in Figura 3.16 sovrapposti a quelli sperimentali utilizzati per la calibrazione.

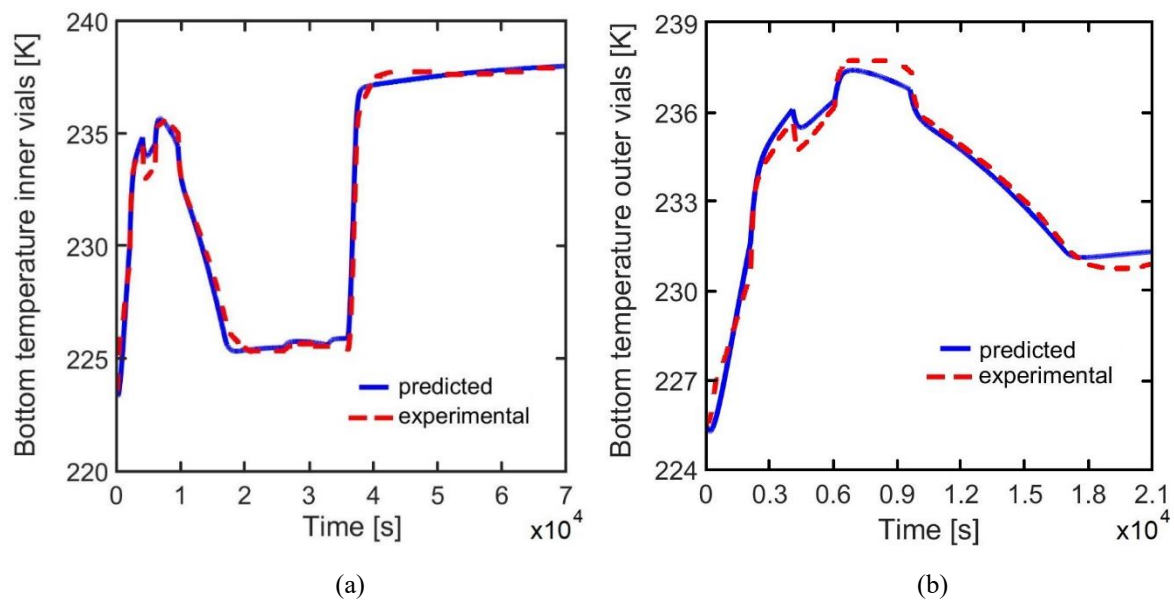


Figura 3.16 Esperimento di calibrazione: Valori sperimentali vs profili predetti in seguito alla calibrazione del modello dinamico (rosso: profilo sperimentale; blu: predetto): a) zona centrale; b) zona laterale.

I due profili riportati si interrompono in istanti differenti, in quanto la calibrazione è eseguita utilizzando dati dalle termocoppie sino al punto in cui le termocoppie registrano il primo flesso; nella zona laterale il tempo finale è minore rispetto alla zona centrale perché il flacone laterale è soggetto a flussi di calore maggiori. La bontà di adattamento del modello ai dati sperimentali è buona; tutti i parametri sono stati stimati in modo altamente preciso (i.e., il valore di t -value ottenuto per ogni parametro è molto maggiore del valore di riferimento al livello di confidenza del 95%, pari a 1.645 (vedi Tabella 3.9)).

In sintesi, il secondo metodo richiede la stima di 11 parametri: 3 indipendenti dalla zona considerata (c_1 , c_2 , α) e quattro differenti per ogni zona (A_{inner} , A_{outer} , B_{inner} , B_{outer} , $R_{0,inner}$, $R_{0,outer}$, $a_{1,inner}$ ed $a_{1,outer}$). L'esperimento dinamico progettato secondo MBDoE è tuttavia sufficientemente informativo per ottenere stime precise per tutti i parametri considerati.

3.2.3.2 Fase di convalida

I parametri ottenuti dalla calibrazione (Tabella 3.9) ed i profili delle variabili manipolate dell'esperimento di convalida, sono stati implementati nel modello dinamico a due zone nel software gPROMS. Per questo caso sono stati simulati 500 scenari; ciascun scenario rappresenta la risposta del modello a valori differenti dei parametri c_1 , c_2 , α , A_{inner} , A_{outer} , $a_{1,inner}$, $a_{1,outer}$, B_{inner} , B_{outer} , $R_{0,inner}$ e $R_{0,outer}$ campionati in maniera casuale assumendo che ciascuno segua una distribuzione di tipo normale, con valor medio e deviazione standard riportate in Tabella 3.9. Il numero di scenari scelto è inferiore rispetto a quelli implementati nel

primo metodo poiché la deviazione standard dei parametri è molto bassa. I dati utilizzati sono riportati nella cartella “gPROMS_data”.

I profili della temperatura di fondo flacone della zona centrale ed esterna predetti dal modello ed i dati sperimentali ottenuti dall’esperimento sono rappresentati in Figura 3.17.

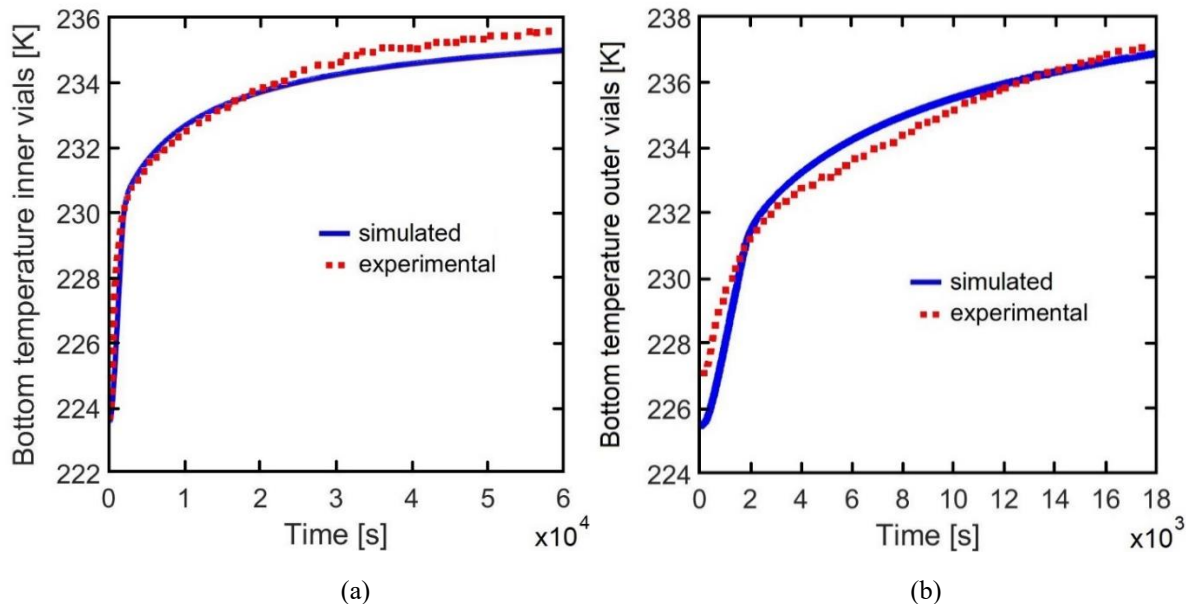


Figura 3.17 Esperimento di convalida: profili di temperatura di fondo flacone ottenuti con simulazione stocastica per il modello dinamico (profili blu) calibrato in gPROMS e dati sperimentali ottenuti (punti rossi). a) zona centrale; b) zona esterna. I profili blu rappresentano i 500 scenari simulati dal modello.

I valori sperimentali di temperatura di fondo flacone sono dati dai valori letti: (i) dalla termocoppia posta nel flacone frontale che presenta i valori di temperatura più alti, per quanto riguarda la zona esterna; (ii) dalla termocoppia posta nel flacone centrale che presenta i valori di temperature più bassi, per quanto concerne la zona interna. I profili corrispondenti a ciascuno scenario simulato risultano pressoché sovrapposti dati i valori estremamente bassi delle deviazioni standard dell’intero set parametrico. Per questo, nelle Figure 3.17 e 3.18 sono stati rappresentati in blu i profili *medi* calcolati dal modello su tutti i 500 scenari simulati. Si osserva che i profili di entrambe le temperature rilevate sono predetti in modo appropriato dal modello (Figura 3.17). È opportuno precisare che il livello d’informazione che si ricava con un esperimento progettato mediante MBDoe è elevato e la stima parametrica ottenuta da un profilo dinamico è altamente precisa; di conseguenza, i vari scenari simulati ottenuti sono sostanzialmente coincidenti con lo scenario medio.

Per quanto riguarda il confronto profilo dinamico dello spessore dello strato ghiacciato per le due zone e stima sperimentale di fine sublimazione a partire da dati di pressione, i risultati ottenuti sono rappresentati in Figura 3.18.

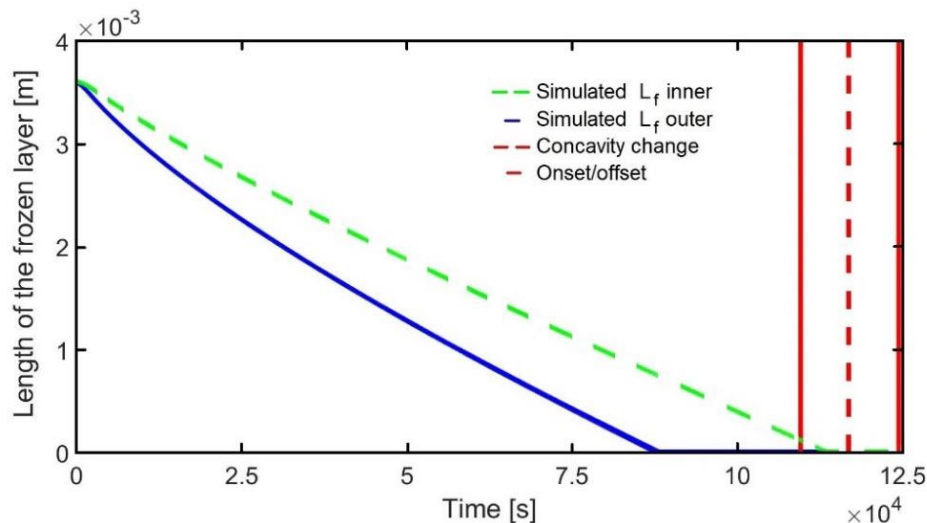


Figura 3.18 *Esperimento di convalida: profili di L_{frozen} ottenuti con simulazione stocastica per il modello dinamico calibrato in gPROMS (linea verde: zona centrale, linea blu: zona esterna). Le tre linee rosse rappresentano rispettivamente il tempo di: (i) onset ($t=109580$ s), (ii) cambio concavità ($t=116840$ s) e offset ($t=124420$ s) basati sui profili di pressione sperimentali manometro Pirani-manometro capacitivo dell'esperimento di convalida.*

Al tempo di *onset* si può affermare, con buona confidenza, che i flaconi posti nella zona esterna hanno terminato la sublimazione. Considerando il profilo di $L_{frozen,in}$, esso tende a zero in un intervallo compreso tra il tempo di *onset* ed il tempo di *offset* calcolato dall'esperimento di convalida.

Si può affermare quindi che il terzo metodo è in grado di predire in modo appropriato la temperatura di flaconi interni ed esterni ed il tempo di fine essiccamento primario di un esperimento scelto, basandosi sull'andamento dello spessore di strato ghiacciato dei flaconi posti nella zona centrale.

Per quanto riguarda la zona esterna, essa presenta maggior variabilità al suo interno, in termini di temperatura misurata di fondo flacone (vedi Figura 3.19); l'allocazione del comportamento estremo alla totalità dei flaconi appartenenti alla zona esterna (28% del totale dei flaconi) può portare ad una sovrastima del comportamento medio della zona esterna (in quanto la termocoppia frontale registra la temperatura più alta). Nella Figura 3.19 è possibile notare la differenza di temperatura registrata dalla lettura di tre termocoppie poste in diverse posizioni nella zona esterna.

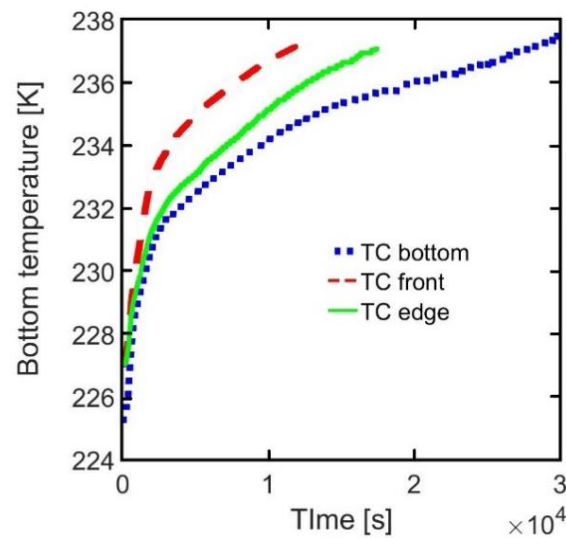


Figura 3.19 Profili di temperatura di fondo flacone registrati da tre termocoppie: frontale, posteriore e laterale.

Tuttavia, la scelta di utilizzare una termocoppia frontale è determinata dal fatto che ci si è posti nella condizione peggiore ma anche più di interesse, in quanto si possono prevenire eventuali collassi della pastiglia dovuti al raggiungimento della temperatura critica.

3.3 Discussione dei risultati

In questo capitolo sono riportate le stime parametriche e le previsioni di modello ottenute con tre modelli e tre diverse metodologie di calibrazione del modello: metodo gravimetrico e stima da termocoppie; calibrazione ottenuta tramite tecnologia SMART ed esperimento progettato tramite tecniche MBDoe. Si noti che, per tutti i casi visti, non è stata considerata nessuna variabilità lotto-lotto che potrebbe aumentare ulteriormente l'incertezza nella stima. Per quanto concerne i risultati ottenuti, si evidenzia che:

- il primo approccio, basato su un modello di tipo pseudo-stazionario, ha dato buoni risultati in termini di predizione di temperatura di fondo flacone e di stima del tempo di fine primaria. L'incertezza parametrica risulta tuttavia molto elevata, da cui consegue una forte dispersione degli scenari simulati in fase di convalida. Oltre a questo, sono necessari almeno quattro esperimenti per effettuare la stima parametrica con dispendio di tempo e risorse;
- il secondo approccio, basato sul modello pseudo-stazionario, effettua la stima parametrica tramite il software SMART associato al liofilizzatore dell'azienda partner. Nonostante questa tecnologia innovativa fornisca una stima del set parametrico ed una ricetta ottimale grazie ad un unico esperimento, in fase di convalida si osservano i seguenti problemi: (i) la predizione di temperatura di fondo flacone non rappresenta adeguatamente i dati sperimentali; i profili simulati, sebbene ricoprano parte del profilo

sperimentale, non seguono il suo stesso *trend* ed hanno inoltre un range molto ampio dato dall'elevata variabilità dei parametri ottenuti; (ii) il tempo di fine primaria è largamente sottostimato, mediamente di 8 ore;

- la terza metodologia, basata sul modello dinamico a due zone, permette di ottenere una stima parametrica statisticamente precisa, utilizzando un unico esperimento progettato tramite MBDoE. L'inserimento in fase di calibrazione del vincolo di coincidenza tra il momento in cui lo strato di ghiaccio è completamente rimosso ed il tempo di offset permette di ottenere una miglior descrizione del processo. La stima parametrica così ottenuta permette di predire in modo accurato le temperature di fondo flacone di entrambe le zone (centrale ed esterna) ed il tempo stimato di fine essiccamento primario. È importante sottolineare inoltre, le stime parametriche sono state ottenute a partire da stime preliminari ricavate per un diverso liofilizzatore e quindi sub-ottimale (la temperatura di parete è differente dall'apparecchiatura utilizzata in questo lavoro di Tesi). Tuttavia, l'esperimento di calibrazione ha permesso di ottenere comunque un esperimento informativo, anche non prevedendo nella progettazione cambiamenti dei parametri R_o e B che si è ritenuto opportuno ristimare per entrambe le zone;

Conclusioni

In questa Tesi è stato proposto un confronto tra tre differenti protocolli sperimentali per l'identificazione di modelli che descrivono la fase di essiccamento primario del processo di liofilizzazione, considerata la più critica dell'intero processo sia in termini di vincoli fisici da rispettare, sia in termini di tempi, energia e costi associati.

L'identificazione dei modelli attraverso dati sperimentali è stata eseguita tramite tre metodologie differenti, in dipendenza della specifica struttura del modello considerato: (i) una prima metodologia tradizionale basata su un modello semplificato pseudo-stazionario in cui la campagna sperimentale ha previsto l'esecuzione di 4 esperimenti a diversi valori di pressione e di temperatura che permettono l'identificazione dei parametri di trasporto di massa ed energia (K_v ed R_p) del modello; (ii) una seconda metodologia, basata sulla tecnologia SMART associata al liofilizzatore Lyostar3 utilizzato per gli esperimenti di questa Tesi, che esegue automaticamente l'identificazione dei parametri di trasporto di massa ed energia (K_v ed R_p) in un singolo esperimento, in seguito utilizzati in un modello pseudo-stazionario a una zona; (iii) una terza metodologia sulla base di un modello dinamico a due zone per il quale è stato progettato un esperimento tramite approccio MBDoE, che permette la calibrazione del modello grazie ad un singolo esperimento

Le tre metodologie sono state confrontate sia in termini di capacità dei modelli identificati di predire le variabili misurate (temperature di fondo flacone e tempo di fine essiccamento primario, sia in termini di prove sperimentali necessarie per l'identificazione del modello.

La prestazione migliore è stata ottenuta con la terza metodologia di calibrazione, che sfrutta tecniche MBDoE per progettare il protocollo sperimentale con cui identificare il modello. I parametri stimati sono altamente precisi, caratterizzati da bassa incertezza e sono determinati grazie ad un unico esperimento, con conseguente riduzione dei tempi e dei costi associati alla fase di identificazione. In particolare: (i) i profili di temperatura predetti rappresentano adeguatamente i dati sperimentali per entrambe le zone in cui sono stati considerati divisi i flaconi, esterna ed interna; (ii) il tempo stimato di fine essiccamento primario è validato dai dati sperimentali in quanto ricade tra il tempo di *onset* ed *offset* dell'esperimento di convalida.

È importante sottolineare che l'esperimento è stato progettato sulla base di stime parametriche preliminari note ottenute per un liofilizzatore *diverso* da quello su cui sono stati svolti gli esperimenti di calibrazione/convalida (numero di ripiani differente e temperature di parete del

liofilizzatore differenti di circa 20 °C) e assumendo a priori l'assenza di un significativo disallineamento (*mismatch*) parametrico tra processo e modello, nonché l'omogeneità (non confermata dagli esperimenti) del valore di resistenza al trasporto di massa iniziale (R_0). Si evidenzia tuttavia che, nonostante la progettazione sub-ottimale, l'approccio risulta affidabile in termini di precisione della stima parametrica e capacità descrittiva del modello convalidato. Uno sviluppo futuro di questa Tesi potrebbe riguardare la considerazione dell'effetto del carico sul processo (*full loading*) per verificare come e quanto le stime parametriche possono variare al variare del carico dei flaconi all'interno del liofilizzatore. In questo modo, ci si avvicinerebbe maggiormente ad una descrizione del processo simile a quella a livello industriale. Inoltre, si potrebbe pensare di applicare l'approccio MBDoE ad un modello multi-flacone (anziché multi-zona), dove l'eterogeneità all'interno del lotto sia descritta da un approccio stocastico (Bano *et al.*, 2020). Un altro aspetto da valutare è la possibilità di implementare la progettazione dell'esperimento utilizzato per la calibrazione del modello in gPROMS anche in Matlab; in questo modo, utilizzando sempre l'approccio MBDoE, si potrebbe implementare in un unico software sia la fase di progettazione sperimentale, sia quella di calibrazione, valutando le differenze che emergono tra un software e l'altro. Si suggerisce infine di testare l'efficacia dei tre approcci utilizzando ulteriori esperimenti sia in fase di calibrazione sia in fase di convalida, ponendosi in condizioni differenti di pressione e temperatura, e utilizzando differenti tipologie di apparecchiature e formulati.

Nomenclatura

A	=	parametro da stimare nel modello pseudo-stazionario (s^{-1})
A_{inner}	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona interna (s^{-1})
A_{outer}	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona esterna (s^{-1})
A_p	=	area interna della sezione trasversale del flacone, tecnologia SMART (cm^2)
A_v	=	area interna della sezione trasversale del flacone (m^2)
a_1	=	parametro da stimare nel modello dinamico (m^2)
$a_{1,inner}$	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona interna (m^2)
$a_{1,outer}$	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona esterna (m^2)
a_2	=	parametro da stimare nel modello dinamico (m^2)
a_3	=	parametro da stimare nel modello dinamico (-)
B	=	parametro da stimare nel modello pseudo-stazionario (m^{-1})
B_{inner}	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona interna (m^{-1})
B_{outer}	=	parametro da stimare nel modello dinamico per la zona esterna (m^{-1})
c_1	=	parametro da stimare ($W m^{-2} K^{-1}$)
c_2	=	parametro da stimare ($W m^{-2} K^{-1} Pa^{-1}$)
c_3	=	parametro da stimare (Pa^{-1})
$c_{p,frozen}$	=	capacità termica del prodotto ghiacciato ($J kg^{-1} K^{-1}$)
$d_{in,vial}$	=	diametro interno del flacone (m)
J_q	=	flusso di calore dalla piastra al fondo flacone ($W m^{-2}$)
J_w	=	flusso di sublimazione ($W m^{-2} K^{-1}$)
K_3	=	termine di irraggiamento dovuto alle piastre ($W m^{-2} K^{-1}$)
K_I	=	conduttività termica del ghiaccio ($cal h^{-1} cm^{-2} K^{-1}$)
K_v	=	coefficiente di trasferimento di calore tra piastra e fondo flacone ($W m^{-2} K^{-1}$)
K_{sv}	=	coefficiente di trasferimento di calore dato da conduzione diretta piastra-fondo flacone e irraggiamento attraverso gas intrappolato ($W m^{-2} K^{-1}$)
L_0	=	spessore iniziale del prodotto ghiacciato (m)
L_{dried}	=	spessore del prodotto secco (m)

L_{frozen}	=	spessore del prodotto ghiacciato (m)
$L_{f,offset,calc}$	=	spessore del prodotto ghiacciato calcolato al tempo di <i>offset</i> (m)
$L_{f,offset,exp}$	=	spessore del prodotto ghiacciato sperimentale al tempo di <i>offset</i> (m)
M	=	quantità totale di acqua sublimata (kg)
M_w	=	peso molecolare dell'acqua (kg mol^{-1})
$m(t)$	=	massa di ghiaccio sublimato al tempo t (g per flacone)
m_0	=	massa iniziale di acqua nel flacone (g per flacone)
\dot{m}_{cd}	=	portata di vapore che fluisce dalla camera al condensatore (kg s^{-1})
\dot{m}_{sub}	=	portata massiva di sublimazione (kg s^{-1})
N	=	numero di flaconi infialati
N_{meas}	=	numero di misurazioni
N_{vials}	=	numero di flaconi caricati nel vassoio
P_0	=	pressione iniziale della camera di liofilizzazione, tecnologia SMART (torr)
P	=	pressione della camera di liofilizzazione, tecnologia SMART (torr)
P_c	=	pressione della camera di liofilizzazione (Pa)
$P_{c,opt}$	=	pressione di camera ottimale, tecnologia SMART (torr)
P_{ice}	=	pressione di vapore del ghiaccio all'interfaccia, tecnologia SMART (torr)
$p_{w,c}$	=	pressione di vapore nei flaconi (Pa)
$p_{w,cd}$	=	pressione di equilibrio solido-vapore (Pa)
$p_{w,i}$	=	pressione di vapore all'interfaccia di sublimazione (Pa)
$Q_{r,v}$	=	portata di calore dalle cornici su cui sono appoggiati i vassoi (W)
$Q_{s,v}$	=	portata di calore dalle piastre poste sopra/sotto il vassoio considerato (W)
$Q_{w,v}$	=	portata di calore dalle pareti della camera (W)
R_g	=	costante universale dei gas ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
R_0	=	parametro da stimare, resistenza al trasporto di massa per $L_{dried} = 0$ (m s^{-1})
$R_{0,inner}$	=	parametro da stimare, resistenza al trasporto di massa iniziale-zona interna (m s^{-1})

$R_{0,outer}$	=	parametro da stimare, resistenza al trasporto di massa iniziale-zona esterna ($m s^{-1}$)
R_p	=	resistenza al trasporto di massa ($m s^{-1}$)
\hat{R}_s	=	resistenza al trasporto di massa attraverso il tappo del flacone ($m s^{-1}$)
T_b	=	temperatura del prodotto a fondo flacone (K)
$T_{b,i,exp}$	=	i-esimo valore di temperatura di fondo flacone sperimentale (K)
$T_{b,i,calc}$	=	i-esimo valore di temperatura di fondo flacone calcolato dal modello (K)
T_{cd}	=	temperatura della camera di condensazione (K)
T_i	=	temperatura dell'interfaccia solido-vapore (K)
T_f	=	temperatura dell'olio siliconico (K)
T_p	=	temperatura del prodotto (K)
$T_{p,overload}$	=	temperatura del prodotto corrispondente al sovraccarico del liofilizzatore (K)
$T_{p,target}$	=	temperatura <i>target</i> del prodotto (K)
T_r	=	temperatura media della cornice (K)
T_s	=	temperatura impostata del vassoio (K)
T_w	=	temperatura media delle pareti della camera (K)
V_c	=	volume della camera di liofilizzazione (m^3)
X	=	coefficiente di regressione ($torr s^{-1}$)
x_i	=	frazione di flaconi appartenenti alla zona i

Lettere greche

α	=	parametro da stimare nel modello dinamico ($Pa s kg^{-1} K^{-1}$)
β_{corr}	=	coefficiente correttivo (K)
ε	=	frazione volumetrica del ghiaccio
λ_{frozen}	=	conducibilità termica del prodotto ghiacciato ($W m^{-1} K^{-1}$)
ρ_{dried}	=	densità del prodotto secco ($kg m^{-3}$)
ρ_{frozen}	=	densità del prodotto ghiacciato ($kg m^{-3}$)
ρ_i	=	densità del prodotto ghiacciato, tecnologia SMART ($g cm^{-3}$)
$\sigma_{i,exp}$	=	deviazione standard dell'i-esima misura di temperatura (K)

σ_{Lf}	=	deviazione standard dello spessore di strato ghiacciato (m)
σ_{sb}	=	costante di Stefan-Boltzmann ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-4}$)
ΔH_s	=	entalpia di sublimazione del ghiaccio (J kg^{-1})
ΔT	=	differenza di temperatura tra l'interfaccia di sublimazione del ghiaccio e il fondo flacone (K)

Riferimenti bibliografici

- Alexeenko A.A, Ganguly A e Nail S.L. (2009). Computational analysis of fluid dynamics in pharmaceutical freeze-drying. *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3483-3494.
- Bano G., De-Luca R., Tomba E., Marcelli A., Bezzo F., Barolo M. (2020). Primary drying optimization in pharmaceutical freeze-drying: a multi-vial stochastic modeling framework. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **59**, 5056–5071.
- Brockmann D. (2017). This message must be herd. In *Public Health* Vol. 1, Article 0065.
- Bruttini R. e Lipias A.I. (2007). Freeze-drying. *Handbook of Industrial Drying* (A.S. Mujundar, ed.), Third. Ed. New York and Basel: CRC Press, 263.
- Fissore D., Pisano R., Barresi A.A. (2010). On the methods based on the Pressure Rise Test for monitoring a freeze-drying process. *Drying Technol.*, **29**, 73-90.
- Fissore, D., Pisano, R., Barresi, A. A., (2011). Advanced approach to build the design space for the primary drying of a pharmaceutical freeze-drying process. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4922-4933.
- Fissore D., Pisano R. e Barresi A.A. (2015). Using Mathematical Modeling and Prior Knowledge for QbD in Freeze-Drying Processes. *Quality by Design for Biopharmaceutical Drug Product Development* (F. Jameel et al.), 565-593. Springer, New York, NY.
- Franceschini G., Macchietto S. (2007). Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art. *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 4846-4872.
- Ganguly A., Varma N., Sane P., Bogner R., Pikal M., Alexeenko A (2017). Spatial variation of pressure in the lyophilization product chamber part 1: computational modeling. *AAPS PharmSciTech.*, **18**, 577-585.
- Gieseler H., Kramer T., Pikal M.J. (2007). Use of Manometric Temperature Measurement (MTM) and SMART™ Freeze Dryer Technology for Development of an Optimized Freeze-Drying Cycle. *J. Pharm. Sci.*, **96**, no. 12.
- Goff J.A. e Gratch S. (1946). Low-pressure properties of water from 160 to 212 °F. *Trans. Am. Heat. Vent. Eng.*, **52**, 95-121.
- Kessler W.J., Davis S.J., Mulhall P.A., Finson M.L. (2006). System for monitoring a drying process. United States Patent Application 0208191 A1.

- Kuu W.Y., Nail S.L., Sacha G. (2009). Rapid determination of vial heat transfer parameters using tunable diode laser absorption spectroscopy (TDLAS) in response to step-changes in pressure-point during freeze-drying. *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1136-1154.
- Liapis A.I., e Bruttini R. (1995). Freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes in vials: dynamic multi-dimensional model of primary and secondary drying stages and qualitative features of the moving interface. *Drying Technology*, **13**, 43-72.
- Milmann M.J., Lipais A.I., Marchello J.M. (1985). An analysis of the lyophilization process using a sorption-sublimation model and various operational policies. *AIChE Journal*, **31**, 1594-1604.
- Morris A.S., Langari K. (2015). *Measurement and Instrumentation: Theory and Application*, Academic Press, 2nd edition, **15**.
- Mortier S. T. F., Van Bockstal P. J., Corver J., Nopens I., Gernaey K. V., De Beer T., (2016). Uncertainty analysis as essential step in the establishment of the dynamic Design Space of primary drying during freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **103**, 71-83.
- Nail S., *et al.* (2017). Recommended Best Practices for Process Monitoring Instrumentation in Pharmaceutical Freeze Drying. *AAPS PharmaSciTech*, **18**, 2379-2393.
- Patel S.M., Doen T., Pikal M.J. (2010). Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. *AAPS PharmSciTech*, **11**, 73-84.
- Pikal M.J. (1985). Use of laboratory data in freeze-drying process design: heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying. *PDA J. Pharm. Sci and Tech.*, **39**, 115-139.
- Pikal M.J., Tang X., Nail S.L. (2005). Automated process control using manometric temperature measurement. United States Patent Application 6971187 B1.
- Pikal M.J., Kramer T., Gieseler H. (2007). Use of Manometric Temperature Measurement (MTM) and SMARTTM Freeze Dryer Technology for Development of an Optimized Freeze-Drying Cycle. In *J. Pharm. Sci.*, **96**, no. 12.
- Pisano R., Fissore D. e Barresi A.A. (2011). Freeze drying cycle optimization using model predictive control techniques. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **50**, 7363-7379.
- Sadikoglu H., Liapis A.I. (1997). Mathematical modelling of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze-drying in trays. Parameter estimation and model discrimination by comparison of theoretical results with experimental data. *Drying Technology*, **15**, 791-810.

- Sadikoglu H., Liapis A.I., Crosser O.K. (1998). Optimal control of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze drying in trays. *Drying technology*, **16**, 399-431.
- Sane P., Varma N., Ganguly A., Pikal M., Alexeenko A., Bogner R. H. (2017) Spatial variation of pressure in the lyophilization product chamber part 2: experimental measurements and implications for scale-up and batch uniformity. *AAPS PharmSciTech*, **18**, 369-380.
- Scutellà B., Plana-Fattori A., Passot S., Bourlés E., Fonseca F., Flick D., Trelea I.C. (2017). 3D Mathematical modelling to understand atypical heat transfer observed in vial freeze-drying. *Appl. Thermal Eng.*, **126**, 226-236.
- Scutellà B., Trelea I.C., Bourlés E., Fonseca F., Passot S. (2018). Use of a multi-vial mathematical model to design freeze-drying cycles for pharmaceuticals at known risk of failure. *IDS 2018, 21st International Drying Symposium Proceedings*, 315-322. Editorial Universitat Politècnica de València.
- Tang X. e Pikal M.J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical research*, **21**, 191-200.
- Tang X., Pikal M.J., Nail S.L. (2005). Freeze-Drying Process Design by Manometric Temperature Measurement: Design of a Smart Freeze-Dryer. *Pharmaceutical Research*, Vol. 22, No. 4.
- Tang X., Pikal M.J., Nail S.L. (2006). Evaluation of Manometric Temperature Measurement, a Process Analytical Technology Tool for Freeze-Drying: Part I, Part II. *AAPS PharmSciTech*, Articles:14,93.
- Trelea I.C. Fonseca F., Passot S., Flick D. (2015). A binary gas transport model improves the prediction of mass transfer in freeze drying. *Drying Technology*, **33**, 1849-1858.
- Velardi A.S., Rasetto V., Barresi A. (2008). Development of simplified models of the freeze-drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chemical Engineering Research and Design*, **86**, 9-22.

Siti Web

www.agenziafarmaco.gov.it Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA, 2018), (ultimo accesso: 07/01/2020).

www.vaccineseuropa.eu Vaccines Europe, An Industry for healthy lives, *How are vaccines produced?* (ultimo accesso: 07/01/2020)

www.tempris.com/freeze-drying-lyophilization/products/ Tempris Sensor Technology (ultimo accesso: 12/02/2020)

<https://www.horiba.com/publications/readout/article/development-of-capacitance-diaphragm-gauge-52911/> Capacitance Diaphragm Gauge (ultimo accesso: 12/02/2020)

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il mio relatore, il prof. Massimiliano Barolo per avermi offerto la possibilità di lavorare su questa Tesi, per l'interesse mostrato verso il mio lavoro, per la disponibilità, per i confronti costruttivi ed i consigli con i quali sono stata costantemente indirizzata durante tutto questo percorso.

Un grazie enorme va ai miei correlatori, Riccardo De Luca ed Emanuele Tomba, che mi hanno aiutato, incoraggiato, corretto e sostenuto in questo lavoro.

Ringrazio la mia famiglia, senza la quale non sarei arrivata dove sono ora. Grazie per la fiducia che mi avete sempre dimostrato, per l'appoggio, per i momenti no, per le crisi esistenziali a cui avete assistito da 5 anni a questa parte. Grazie per aver creduto in me ed aver investito sul mio futuro.

Un grazie speciale va ad Andrea per avermi sostenuta e incoraggiata per lunghi mesi durante la redazione di questa tesi. Grazie per essere sempre stato presente, per aver ascoltato i miei sfoghi con infinita pazienza e per avermi fatto da psicologo personale.

Grazie a Lorenzo e Silvio. Senza di voi i sei mesi di tirocinio formativo non sarebbero stati gli stessi.

Tutti i miei amici e parenti hanno avuto un peso determinante nel conseguimento di questo risultato. Grazie per aver condiviso con me in questi anni un percorso così importante, ma non privo di momenti di difficoltà. Grazie per avermi sempre incoraggiato a non mollare e per avermi sostenuto con la parola giusta, con una pacca sulla spalla o con un drink (che va sempre bene).

Infine, un grazie va anche a me stessa. Per l'impegno e la determinazione impiegati per arrivare a questo traguardo, per averci provato ed esserci riuscita. Perché è giusto, in questi momenti, riconoscersi il merito per il proprio successo.

La strada è in salita solo per chi è destinato ad arrivare in alto.

Antonio Pavan